

ORSAY

Série A

N° D'ORDRE 689

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

JACQUES MARCHAND

Contribution à la détermination de la structure des alcaloïdes
peptidiques - Alcaloïdes de : Hymenocardia acida Tul.

Lasiodiscus marmoratus C.H.Wright, Waltheria americana L.

Myrianthus arboreus P. Beauv.

Soutenue le 28 Octobre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. DAVID

Président

FETIZON

JANOT

GOUTAREL

} Examineurs

ORSAY

Série A

N° D'ORDRE 689

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

PAR

JACQUES MARCHAND

Contribution à la détermination de la structure des alcaloïdes
peptidiques - Alcaloïdes de : Hymenocardia acida Tul.

Lasiodiscus marmoratus C.H. Wright, Waltheria americana L.
Myrianthus arboreus P. Beauv.

Soutenue le 28 Octobre 1970 devant la Commission d'Examen

MM. DAVID

Président

FETIZON
JANOT
GOUTAREL

} Examineurs



A MONSIEUR SERGE DAVID

Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay

qui a bien voulu me faire l'honneur
de présider le jury de cette thèse

A MONSIEUR MARCEL FETIZON

Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay

A MONSIEUR MAURICE-MARIE JANOT

Membre de l'Académie des Sciences

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

A MONSIEUR ROBERT GOUTAREL

Directeur de Recherche au Centre National
de la Recherche Scientifique

qui ont accepté de juger ce travail

En hommage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR MAURICE-MARIE JANOT

Membre de l'Académie des Sciences

Membre de l'Académie Nationale de Médecine

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

Directeur de l'Institut de Chimie des Substances

Naturelles du Centre National de la Recherche Scientifique

qui m'a fait l'honneur de m'accueillir
dans son laboratoire et m'a prodigué
tant de marques d'intérêt et de bienveillance

En hommage déferent de respectueuse et profonde gratitude.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551520_0016

A MONSIEUR ROBERT GOUTAREL

Directeur de Recherche au Centre National
de la Recherche Scientifique

qui m'a confié le sujet de cette thèse et en
a guidé la réalisation en ne cessant de me
faire bénéficier de sa grande expérience et
de sa bienveillante compréhension

En témoignage de profond attachement et de vive reconnaissance.

A MADemoisELLE MARY PAÏS

Chargée de Recherche au Centre National
de la Recherche Scientifique

qui a dirigé ce travail avec autant de
compétence et de dynamisme que
d'inlassable bienveillance

En témoignage de sincère gratitude et de profonde amitié.

A MONSIEUR FRANCOIS-XAVIER JARREAU

Chargé de Recherche au Centre National
de la Recherche Scientifique

qui a dirigé ce travail, m'a fait profiter
de son esprit de rigueur et a su me
communiquer son enthousiasme

En témoignage de profonde reconnaissance et de très
sincère amitié.

A MES PARENTS

En témoignage de reconnaissance et de
profonde affection

A MA FEMME

A MA FAMILLE

A MES AMIS

AVANT-PROPOS

L'étude des alcaloïdes est un domaine de la chimie des Substances Naturelles qui a constamment suscité l'intérêt des pharmaciens : ceci est dû à la variété de ces substances, mais aussi au fait que ces alcaloïdes constituent le plus souvent les principes actifs des plantes qui les renferment.

C'est ainsi que, depuis plus de trente ans, Monsieur le Professeur JANOT et Monsieur R. GOUTAREL se sont spécialisés dans leur étude. Après d'importants résultats dans le domaine des "plantes à alcaloïdes indoliques", puis dans celui des "plantes à alcaloïdes stéroïdiques", Monsieur R. GOUTAREL a dirigé ses investigations vers d'autres familles botaniques, tout en continuant l'étude de la famille des APOCYNACEES.

Au cours de l'investigation de ces familles botaniques, Mademoiselle M. PAÏS a déterminé, en 1964, la structure de la pandamine (1), isolée du Panda oleosa Pierre. La pandamine constituait le premier représentant d'un nouveau type : "les alcaloïdes peptidiques", dont la structure ait été entièrement établie. Une étude préliminaire lui avait, d'autre part, permis de mettre en évidence des alcaloïdes sans doute voisins de la pandamine, dans une autre plante : le Waltheria americana.

Dans le cadre de ces recherches, Messieurs M.-M. JANOT et R. GOUTAREL m'ont fait l'honneur de me confier, sous la direction de Mademoiselle M. PAÏS et de Monsieur F.-X. JARREAU, l'étude chimique d'alcaloïdes peptidiques extraits successivement de plantes diverses : Hymenocardia acida Tul. (Hymenocardiacees), Lasiodiscus marmoratus C.H. Wright (Rhamnacees), Waltheria americana L. (Sterculiacees), Myrianthus arboreus P. Beauv. (Urticacees).

Cette étude a conduit à l'isolement de neuf alcaloïdes peptidiques nouveaux, la détermination de leur structure fait l'objet de ce travail.

Je ne saurais commencer cet exposé sans remercier :

- . Le Centre National de la Recherche Scientifique qui a permis la réalisation matérielle de ce travail ;
- . M. le Professeur J. LE MEN qui a bien voulu me parrainer auprès de cet organisme ;
- . M. J. RENARD, Directeur de l'Omnium Chimique, qui nous a procuré les échantillons d'Hymenocardia acida et de Lasiodiscus marmoratus ;
- . M. Q. KHUONG-HUU, Maître de Recherche, dans l'équipe duquel j'ai été nommé au C.N.R.S. et qui a toujours suivi avec bienveillance le développement de ces recherches ;
- . Les services de R.M.N., de Microanalyse et de Spectrométrie de Masse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ;

Je tiens également à remercier Mlle M. COLIN et tous les membres du service du Professeur M.-M. JANOT, du laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Paris et de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles ;

et plus particulièrement, mes camarades de laboratoire :

F. FRAPPIER, R. SARFATI, Mlle J. THIERRY et A. MONTAGNAC, qui,

à des titres divers, m'ont aidé et conseillé ;

- . M. le Professeur M.L. GIRARD, Pharmacien Chef de l'Hôpital Lariboisière, mon Maître d'Internat.

x

x x

Le plan adopté pour l'exposé de ce travail est le suivant :

AVANT-PROPOS

PARTIE THEORIQUE

Chapitre I	Introduction
Chapitre II	Extraction et isolement des alcaloïdes
Chapitre III	Détermination de la structure de l'Hymenocardine - Etude spectrale et fonctionnelle - Etude chimique par dégradation - Etude du spectre de masse
Chapitre IV	Détermination de la structure de la Lasiodine A - Etude spectrale - Etude chimique - Etude du spectre de masse

Chapitre V	Détermination de la structure des Adouétines X, Y et des Myrianthines A, B et C - Examen des spectres U.V. et I.R. - Etude particulière de chaque alcaloïde
Chapitre VI	Détermination de la structure de l'Adouétine Z et de la Lasiodine B - Examen des spectres U.V. et I.R. - Etude particulière de chaque alcaloïde
Chapitre VII	Détermination de la configuration d'un fragment B - Obtention d'un fragment correspondant à B - Etude par R.M.N. de la configuration du fragment isolé

PARTIE EXPERIMENTALE

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

==:==:==:==:==:==:==:==:==

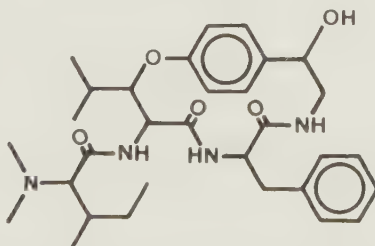
PARTIE THÉORIQUE

Chapitre I

INTRODUCTION

I RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS

En 1964, la structure d'un alcaloïde nouveau, la pandamine, 1, extrait du Panda oleosa Pierre (Pandacées) (2), est élucidée par M. PAÏS (1).



1

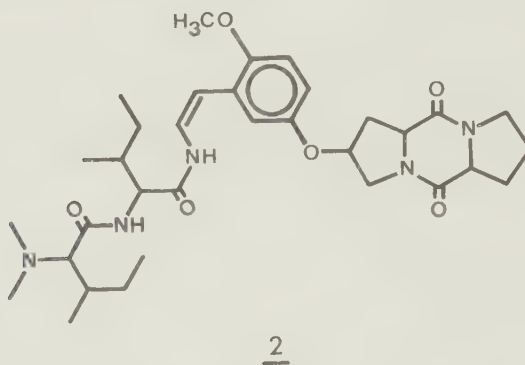
La formule développée de cet alcaloïde a été déduite essentiellement des résultats de l'hydrolyse alcaline et de l'hydrolyse acide. La pandamine est constituée par l'enchaînement de quatre fragments, dont trois sont des acides α -aminés :

- phénylalanine
- N-diméthyl-isoleucine
- β -hydroxy-leucine

Le quatrième fragment étant un aminophénol, donne à la pandamine une nature hétéropeptidique originale, en permettant la formation d'un cycle à 14 chaînons comportant une fonction éther-oxyde placée en β d'une liaison peptidique. Peu après, la structure de la pandaminine, autre alcaloïde extrait du Panda oleosa, est déterminée par les mêmes méthodes (3).

Elle ne diffère de celle de la pandamine que par la présence d'une N-diméthyl-valine à la place de la N-diméthyl-isoleucine.

En 1965, la structure de la zizyphine, 2, alcaloïde extrait du Zizyphus oenoplia Mill. (Rhamnacées) (4), est établie par ZBIRAL et coll. (5).



Cette structure, démontrée exclusivement par dégradation chimique, présentait des points communs avec celle de la pandamine :

- présence d'un N-diméthyl-acide aminé terminal qui confère à la molécule sa basicité ;
- présence d'un aminophénol dont la fonction phénol est engagée dans une liaison éther avec un acide α -aminé- β -hydroxylé.

Une structure cyclique à 14 chaînons du type de la pandamine n'a pas été envisagée dans le cas de la zizyphine.

En 1965, également, WARNHOFF et coll. (6) ont proposé pour la céanothine B, alcaloïde du Ceanothus americanus (Rhamnacées) (7), une structure comportant des éléments analogues à ceux rencontrés dans la pandamine : le N-diméthyl-acide aminé terminal et l'aminophénol relié par une liaison éther à un acide α -aminé- β -hydroxylé.

A côté de ces trois alcaloïdes nouveaux présentant certains éléments structuraux communs, d'autres alcaloïdes avaient été mis en évidence ou isolés et leur étude succincte avait permis de déceler rapidement leur nature peptidique. Il en était ainsi pour les adouétines X, Y et Z, isolées du Waltheria americana L. (Sterculiacées) par M. PAÏS (8).

Il est apparu que la pandamine constituait le premier terme d'un nouveau type de substances naturelles d'origine végétale, auquel a été donné le nom d' "alcaloïdes peptidiques". Depuis, ce nouveau type de structure a été caractérisé dans différentes familles botaniques, en particulier dans les Rhamnacées, par divers groupes de chercheurs : TSCHESCHE, KLEIN, SERVIS, BOULVIN.

II EXPOSE DES TRAVAUX PERSONNELS

Le travail qui nous a été confié dans le cadre de ces recherches est l'étude chimique de neuf alcaloïdes isolés de quatre plantes d'origine exotique (tableau I).

TABLEAU I

FAMILLE	ESPECE	ALCALOIDES
HYMENOCARDIACEES	<u>Hymenocardia acida</u> Tul.	Hymenocardine
RHAMNACEES	<u>Lasiodiscus marmoratus</u> C.H. Wright	Lasiodine A Lasiodine B
STERCULIACEES	<u>Waltheria americana</u> L.	Adouétine X Adouétine Y Adouétine Z
URTICACEES	<u>Myrianthus arboreus</u> P. Beauv.	Myrianthine A Myrianthine B Myrianthine C

Les méthodes générales d'étude des premiers alcaloïdes étudiés : hymenocardine, lasiodine A, ont été identiques à celles précédemment mises au point lors de la détermination de la structure de la pandamine.

Cependant, la connaissance d'un nombre plus important d'alcaloïdes peptidiques a permis d'établir une classification de ceux-ci, et de dégager certaines lois générales permettant d'aborder leur étude, principalement par spectrométrie de masse. Les dégradations chimiques n'ont, dès lors, été utilisées que pour confirmer les hypothèses proposées et établir les configurations absolues des différents fragments.

Chapitre II

EXTRACTION ET ISOLEMENT DES ALCALOÏDES

Les méthodes utilisées ne varient guère d'une plante à l'autre, ce sont les méthodes générales d'extraction des alcaloïdes. Il y a lieu de noter que la concentration dans la plante est toujours faible, en effet, le taux maximum d'alcaloïdes bruts rencontré est de 1,8% ; il s'abaisse à 0,06% dans certains cas.

Les alcaloïdes bruts sont purifiés par chromatographie ; cette purification est rendue délicate par la forte polarité et l'insolubilité souvent importante de ces molécules dans les solvants organiques usuels.

Les alcaloïdes purifiés cristallisent facilement dans les solvants habituels et possèdent le plus souvent des points de fusion élevés.

Les résultats obtenus lors de l'extraction et de l'isolement de ces alcaloïdes peptidiques, en particulier le taux global d'alcaloïdes présent dans chaque plante, sont résumés dans le tableau II.

Famille	Espèce	Partie de plante utilisée	Solvant d'extraction	Taux d'alcaloïdes bruts	Chromatographie	Alcaloïdes isolés purs	Alcaloïde majeur
Hymenocardiacees	<u>Hymenocardia</u> <u>acida</u> Tul.	Ecorces de racines	éther	0,3 %.	silice-célite	Hymenocardine	XXXX
Rhamnacees	<u>Lasiodiscus</u> <u>marmoratus</u> C. H. Wright	Feuilles	éther	1,8 %.	Florisil	Lasiodine A Lasiodine B	XX XXXX
Sterculiacees	<u>Waltheria</u> <u>americana</u> L.	Plante entière	benzène	0,5 %.	silice-célite	Adouétine X Adouétine Y Adouétine Z	XX XX XXXX
Urticacees	<u>Myrianthus</u> <u>arboreus</u> P. Beauv.	Feuilles de Guinée Feuilles du Congo Kinshasa	éther	0,06 %. 0,3 %.	silice	Myrianthine A Myrianthine B Myrianthine C	XXXX XX XXXX

TABLEAU II

Chapitre III

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE L'HYMENOCARDINE

L'hymenocardine (9), alcaloïde isolé de l'*Hymenocardia acida* Tul. (Hymenocardiaceae), est obtenue cristallisée dans l'acétone, $F = 261^\circ$, $[\alpha]_D = -124^\circ$ ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/1, $c = 1$) et répond à la formule brute $\text{C}_{37}\text{H}_{50}\text{O}_6\text{N}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$, le poids moléculaire étant confirmé en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 674$.

I ETUDE SPECTRALE ET FONCTIONNELLE

1 - Spectre I.R. (nujol) -

Il montre des absorptions intenses à 3280, 1635 et 1520cm^{-1} , attribuables à des fonctions amides secondaires et révélant ainsi la nature probablement peptidique de cet alcaloïde. On note, en outre, la présence d'une bande à 1700cm^{-1} pouvant correspondre à une fonction cétone.

2 - Spectre U.V. -

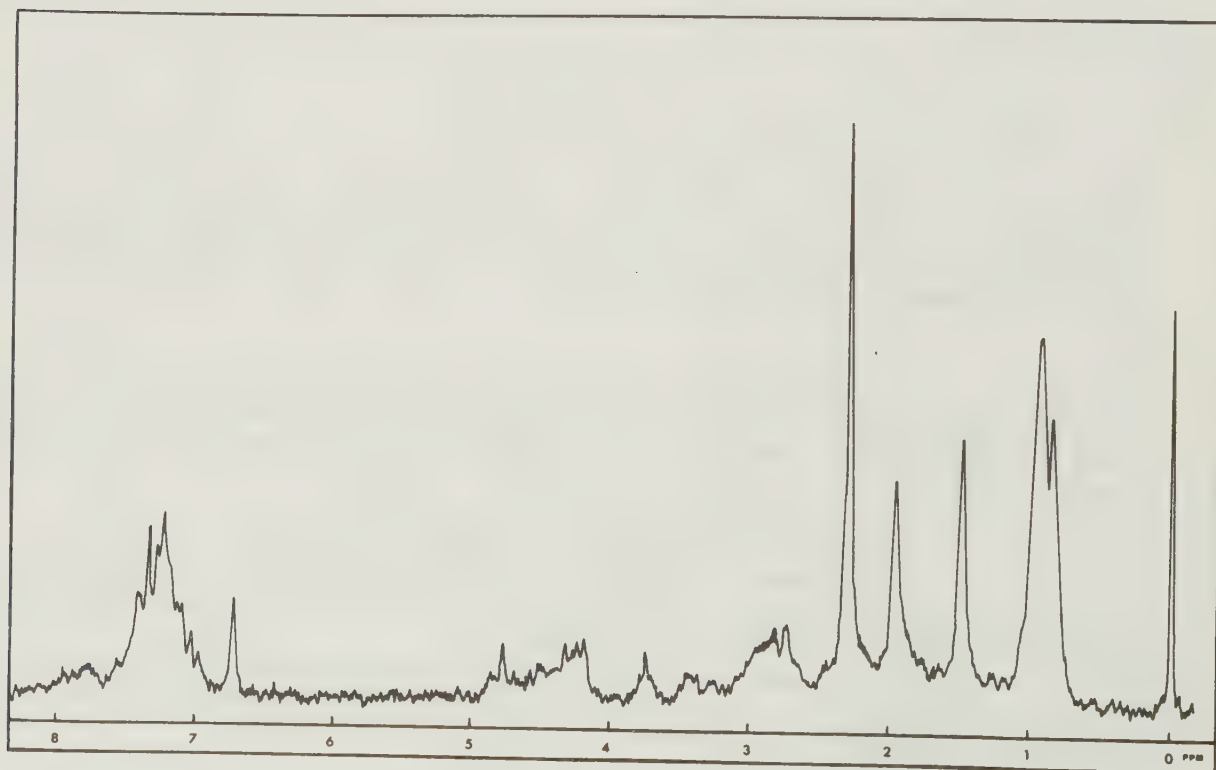
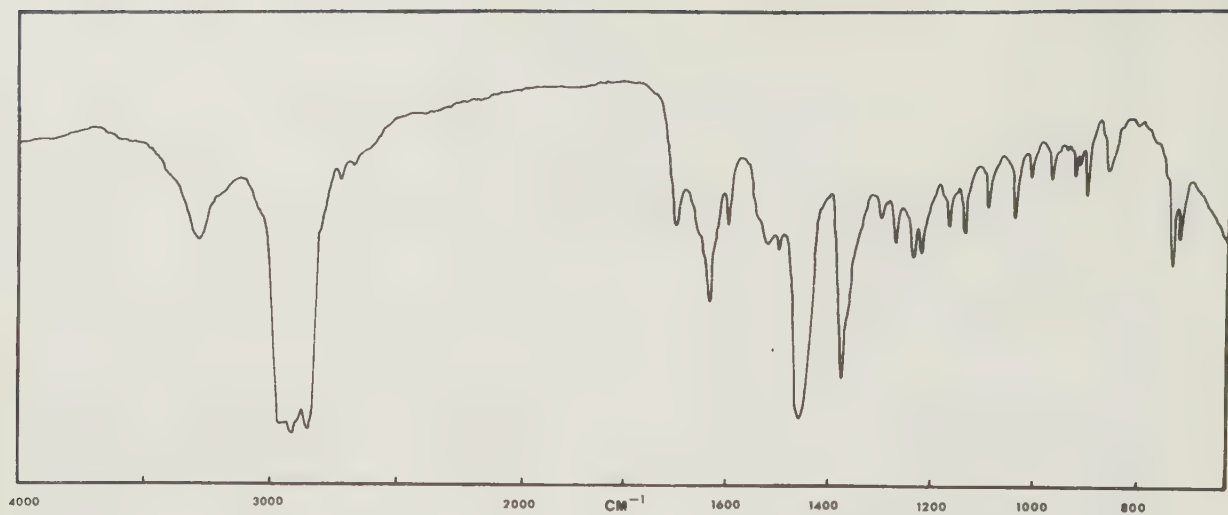
Il présente trois maximums à λ 222, 263 et 289 nm ($\log \epsilon$ 4,66, 4,17 et 4,02). L'absorption à 263nm peut être attribuée au chromophore d'une cétone en α d'un cycle benzénique, tandis que les absorptions à 222 et 289 nm pourraient correspondre à un chromophore de type indolique.

3 - Spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) -

Il présente à 2,30ppm un singulet correspondant à 6 protons ; ce signal se déplaçant à 3,18ppm lorsque le spectre est effectué dans l'acide trifluoroacétique, peut correspondre à un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ basique.

Deux singulets situés à 1,48 et 1,94ppm et correspondant à 3 protons chacun peuvent être considérés comme les signaux de deux méthyles portés par un carbone entièrement substitué.

Le spectre présente, en outre, des signaux peu différenciés entre 0,7 et 1,1 ppm, attribuables à 4 méthyles aliphatiques et, entre 6,7 et 7,9ppm correspondant à environ 10 protons aromatiques.



Spectres I.R. et de R.M.N. de l'hymenocardine

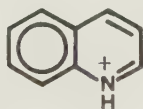
4 - Spectre de masse -

Il présente un pic moléculaire $M^+ = 674$ qui confirme les résultats de l'analyse. On note surtout la présence d'un pic très important situé à m/e 114, déjà observé dans le spectre de la pandamine (1) et de deux autres ions intenses situés à m/e 130 et m/e 170.

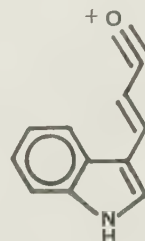
L'obtention d'un mono-oxalate d'hymenocardine, cristallisé dans un mélange méthanol/acétone, $F = 225^\circ$, et répondant à la formule brute $C_{39}H_{50}O_9N_6 \cdot 2H_2O$, indique que cet alcaloïde possède un seul atome d'azote basique, qui ne peut être que celui du groupe $N(CH_3)_2$ révélé par le spectre de R. M. N.

La réduction de l'hymenocardine par le borohydrure de sodium donne un mélange de deux alcools épimères acétylables, ce qui confirme l'existence de la fonction cétone mise en évidence dans les spectres I.R. et U.V. de l'alcaloïde. Dans le spectre U.V. de ce mélange d'alcools épimères, l'absorption à λ 263nm a disparu et l'on observe dans ce spectre trois maximums à λ 222, 281 et 289 nm, caractéristiques d'un chromophore indolique du type tryptophane.

La présence de cet acide aminé est confirmée par les ions intenses m/e 130 et m/e 170 du spectre de masse :



m/e 130



m/e 170

L'étude spectrale et fonctionnelle de l'hymenocardine révèle donc la nature peptidique de cet alcaloïde ; elle met en outre en évidence la présence probable dans cette molécule d'une cétone aromatique, d'un groupe $N(CH_3)_2$ et du tryptophane.

Cependant, ces résultats ne permettent pas de postuler une hypothèse de structure, c'est pourquoi une étude chimique par dégradation s'est avérée indispensable pour tenter d'identifier les différents fragments de la molécule.

II ETUDE CHIMIQUE

L'hydrolyse en milieu acide est la méthode la plus généralement utilisée pour l'étude de la structure des polypeptides, car l'hydrolyse en milieu alcalin conduit à des produits d'hydrolyse racémisés et peut détruire de façon importante certains acides aminés.

Lors de l'étude de la pandamine, deux procédés d'hydrolyse acide avaient été utilisés (1) :

- a) - Hydrolyse par HCl 6N à 140° pendant 24 heures, aboutissant à une dégradation totale de l'alcaloïde, mais ne donnant que de faibles quantités des différents fragments, du fait d'une décomposition de la molécule en produits résineux noirs ;
- b) - Par ébullition à reflux dans un mélange acide chlorhydrique/acide acétique/eau (2/1/1) ; l'hydrolyse de l'alcaloïde est moins brutale et permet d'isoler des fragments plus importants sans décomposition notable.

C'est ce second procédé qui a été choisi pour dégrader la molécule d'hymenocardine.

1°) - Hydrolyse acide de l'hymenocardine -

Après 8 heures d'hydrolyse dans ces conditions, l'hydrolysate est un mélange de produits amphotères dont l'analyse en CCM (silice, révélation à la ninhydrine) permet de caractériser :

- a) - le tryptophane ;
- b) - un produit dont le R_f supérieur à celui des acides aminés indique qu'il pourrait s'agir d'un aminophénol ;
- c) - un troisième produit révélé par le réactif de Dragendorff sulfurique et dont le R_f correspond à celui d'un acide aminé ou d'un peptide de petit poids moléculaire.

Ce produit n'étant pas révélé par la ninhydrine, renferme vraisemblablement la fonction amine tertiaire mise en évidence par les méthodes physiques.

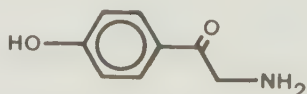
Le traitement de l'hydrolysate acide sur résine sulfonique en phase H⁺, suivi d'élution par l'ammoniaque, permet de libérer les fonctions basiques de ces produits.

Par passage sur une résine carboxylique en phase H⁺, suivi d'élution par de l'eau, seul le produit b le plus basique reste fixé sur la résine. Il est élué par une solution ammoniacale.

a) - Etude du produit b retenu par la résine carboxylique -

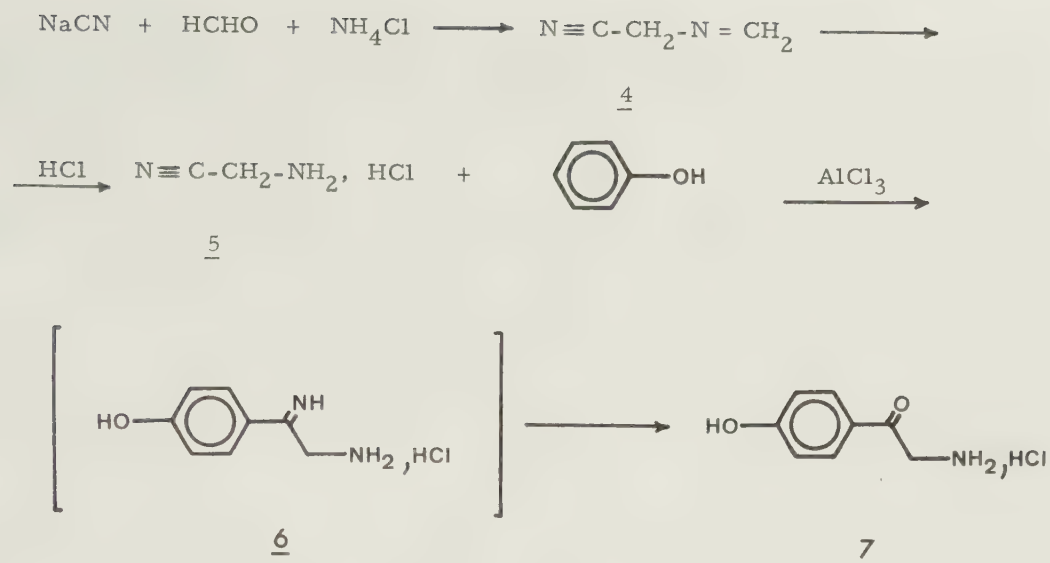
Ce produit est purifié sous forme de chlorhydrate cristallisant dans l'éthanol absolu, F = 255° (déc.), de formule brute C₈H₉O₂N.HCl.

Le spectre I.R. (nujol), ν CO aromatique à 1665cm⁻¹, et le spectre de R.M.N. (D₂O) : singulet à 4,62ppm (CH₂ en α d'hétéroatomes), système A₂B₂ (J_{AB} = 9 Hz) entre 6,73 et 7,91ppm (noyau benzénique paradisubstitué), permettent de proposer pour ce produit la structure 3 de la p-hydroxy-ω-amino-acétophénone.



3

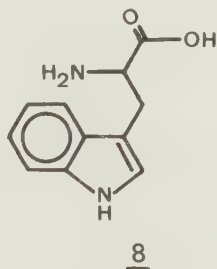
Cette structure est confirmée par la synthèse du chlorhydrate de 3, selon ASSCHER (10) :



b) - Séparation et identification des produits a et c non fixés sur la résine carboxylique -

Les deux produits a et c non retenus par la résine carboxylique sont séparés par chromatographie sur silice.

. Le L-tryptophane, 8 (tache violette à la ninhydrine) est élué par le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1), cristallisé dans l'éthanol absolu et identifié par comparaison avec un échantillon de référence (spectre I.R., $[\alpha]_{\text{D}} = -32^\circ$ (H_2O , $c = 1$)).

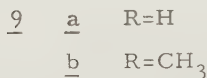
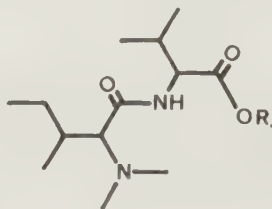


. Le second produit, révélé en CCM par le réactif de Dragendorff sulfurique, est élué par le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (4/1). La structure de ce produit 9a a été établie à partir de son ester méthylique 9b, cristallisé dans l'éther de pétrole, $F = 68^\circ$, $[\alpha]_{\text{D}} = -10^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), de formule brute $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{N}_2$ confirmée en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 272$.

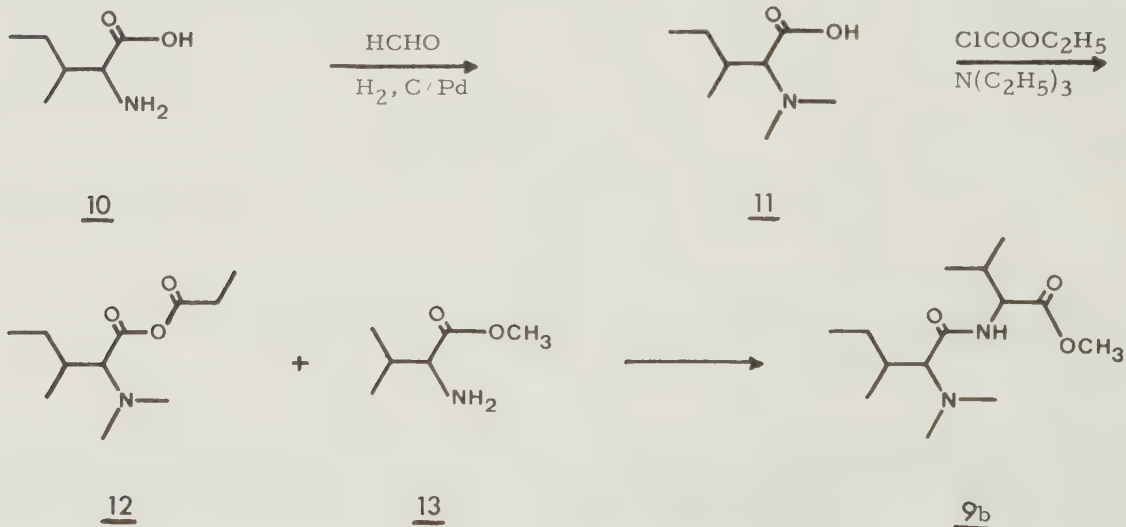
Le spectre I.R. de 9b (CCl_4) présente des absorptions intenses à 3390 et 1695 cm^{-1} attribuables à une liaison peptidique, ainsi que la bande à 1750 cm^{-1} d'une fonction ester.

Le spectre de R.M.N. (CDCl_3) présente, entre 0,84 et 1,07ppm, des signaux pouvant correspondre à 4 méthyles aliphatiques, à 2,29ppm le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ et à 3,74ppm le singulet du groupe COOCH_3 . Un doublet à 2,59ppm ($J = 5\text{Hz}$) est attribué à un hydrogène en α du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ et un pic large situé à 6,90ppm peut correspondre à un proton amidique.

L'examen comparé de la formule brute et des spectres I.R. et de R.M.N. de l'ester 9b, permet de proposer pour 9a une structure de N-diméthyl-isoleucyl-valine.



La synthèse stéréospécifique de l'ester méthylique de la N-diméthyl-isoleucyl-valine, 9b, à partir de la L-isoleucine et de la L-valine confirme la structure du dipeptide, 9a.

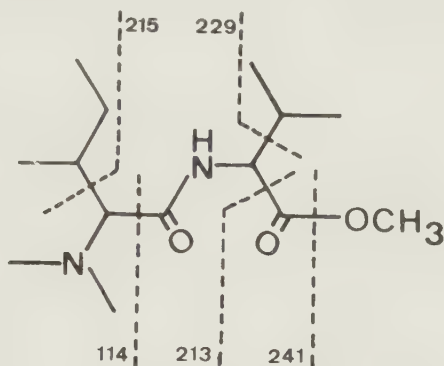


La L-isoleucine, 10, est diméthylée à l'azote par hydrogénation catalytique en présence de formaldéhyde; cette technique décrite par BOWMAN (11) respecte la configuration du carbone lié à la fonction amine.

Le peptide 9b a été préparé par l'intermédiaire de l'anhydride mixte, 12, qui résulte de l'action du chloroformiate d'éthyle en présence de triéthylamine sur la N-diméthyl-L-isoleucine, 11, (12, 13, 14). L'anhydride mixte, 12, n'est pas isolé, mais condensé directement avec l'ester méthylique de la L-valine, 13, pour donner 9b.

L'ester ainsi obtenu, purifié par sublimation, présente un pouvoir rotatoire et des spectres I.R. et de R.M.N. identiques à ceux de l'ester méthylique du dipeptide naturel : le peptide 9a a donc la structure d'une N-diméthyl-L-isoleucyl-L-valine.

La structure de ce peptide étant connue, il devient possible d'interpréter le spectre de masse de l'ester 9b. Les ions les plus importants observés sur ce spectre, notamment l'ion m/e 114 (pic de base), résultent de fragmentations en α d'hétéroatomes comme le montre le schéma suivant :



On doit noter que la liaison peptidique unissant la N-diméthyl-isoleucine à la valine est restée intacte au cours de l'hydrolyse : il est, en effet, connu que l'encombrement stérique important créé par les chaînes latérales de ces deux acides aminés rend la liaison peptidique plus résistante à l'action des acides (15).

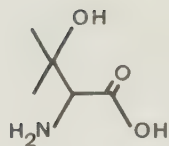
La dégradation chimique de l'hymenocardine par hydrolyse acide a donc permis d'identifier trois fragments de cet alcaloïde :

- un aminophénol : la p-hydroxy- ω -amino-acétophénone, 3 ;
- un acide α -aminé : le L-tryptophane, 8 ;
- un dipeptide : la N-diméthyl-L-isoleucyl-L-valine, 9a.

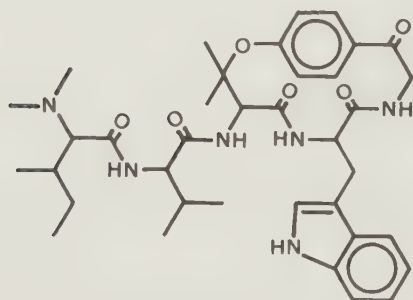
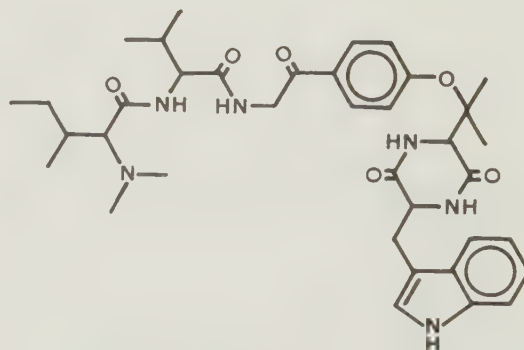
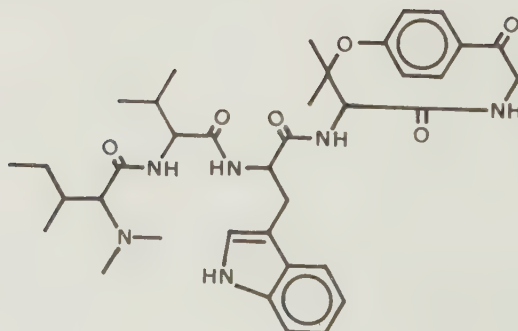
Dans l'alcaloïde, les fonctions NH_2 et COOH de ces fragments 3, 8 et 9a sont engagées dans des liaisons amides, puisque l'hymenocardine ne renferme aucune de ces fonctions libre.

L'examen de la formule brute de l'alcaloïde permet alors de déduire l'existence d'un quatrième chaînon, $\text{C}_5\text{H}_8\text{ON}$, non isolé dans ces conditions d'hydrolyse, et que l'on peut supposer engagé dans une liaison éther avec l'aminophénol, 3, puisque l'hymenocardine n'a pas de fonction phénol libre.

Cet élément pourrait donc être un acide α -aminé β -hydroxylé, la β -hydroxy-valine, 14. Les deux singulets à 1,48 et 1,94ppm, observés dans le spectre de R.M.N. de l'alcaloïde, peuvent correspondre au groupe gem-diméthyl de ce fragment.

14

Il est alors possible d'envisager, pour la structure de l'hymenocardine, les trois hypothèses 15, 16 et 17, qui ne diffèrent entre elles que par le mode d'enchaînement de trois fragments, puisque la N-diméthyl-isoleucyl-valine est obligatoirement en position terminale.

151617

La structure 15 est caractérisée par un cycle à 14 chaînons comparable à celui de la pandamine. Elle renferme toutefois un acide aminé supplémentaire, la valine, située entre la N-diméthyl-isoleucine et la β -hydroxy-valine.

La structure 16 rapprocherait l'hymenocardine de la zizyphine, 2 : le tryptophane et la β -hydroxy-valine sont reliés par deux liaisons peptidiques formant une dicétopipérazine disubstituée.

Quant à la structure 17, comprenant un cycle à 11 chaînons, l'impossibilité de la construire à l'aide de modèles moléculaires la rend peu probable.

Pour choisir entre les structures 15 et 16, il est nécessaire d'obtenir par dégradation partielle de l'hymenocardine, un fragment assez important ayant conservé plusieurs liaisons peptidiques intactes. L'hydrolyse alcaline, malgré ses inconvénients, a donné, dans ce cas, des renseignements sur le mode d'enchaînement des divers éléments.

Un procédé de dégradation en milieu alcalin avait été mis au point lors de l'étude de la pandamine (1), et consistait à hydrolyser l'alcaloïde par une solution hydro-alcoolique de soude 4n à reflux. Cependant, cette technique avait donné de mauvais résultats sur un dérivé de la pandamine à fonction cétone.

Des essais ont donc été effectués sur l'hymenocardine et son produit de réduction par NaBH_4 . Les résultats obtenus étant analogues et satisfaisants, l'hydrolyse alcaline a été entreprise sur l'alcaloïde lui-même.

2°) - Hydrolyse alcaline de l'hymenocardine -

L'hydrolyse est effectuée dans la soude méthanolique 4n à reflux pendant 15 heures et la solution aqueuse obtenue est séparée en trois fractions :

- | | |
|--------------|---------------------|
| - Fraction 1 | produits basiques |
| - Fraction 2 | produits acides |
| - Fraction 3 | produits amphotères |

a) - Fraction 1 : produits basiques -

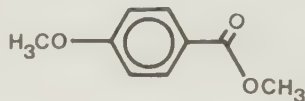
Obtenue par extraction au chlorure de méthylène, son analyse en CCM n'ayant pas montré de produits nets, elle n'a pas été étudiée plus avant.

b) - Fraction 2 : produits acides -

Le résidu de l'extraction à l'éther après acidification est analysé en CCM : aucune tache n'apparaît par révélation à la ninhydrine, alors que le réactif de Dragendorff sulfurique met en évidence un seul produit. Celui-ci, traité par le diazométhane, fournit un ester méthylique chromatographié sur alumine et cristallisé.

Le spectre de R. M. N. (CDCl_3) de cet ester 18 présente deux singulets à 3,86 et 3,88ppm, attribuables à un groupe COOCH_3 et à un méthoxyle aromatique, et entre 6,83 et 8,17ppm, le système A_2B_2 ($J_{\text{AB}} = 9\text{Hz}$) d'un cycle benzénique para-disubstitué.

Ce spectre permet de proposer pour l'ester 18 la structure de l'anisate de méthyle, confirmée par comparaison (I. R., R. M. N.) avec un échantillon de référence.

18

La présence de ce fragment peut résulter d'une rupture en α - β du cycle benzénique de l'aminophénol, 3 :



Une telle coupure en milieu alcalin d'une α -aminocétone aromatique, conduisant à un acide, a déjà été décrite (16).

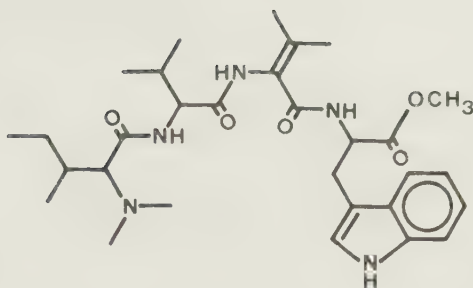
c)-Fraction 3 : produits amphotères -

La phase aqueuse résiduelle a été étudiée après élimination des sels minéraux, par extraction du résidu sec avec le mélange chloroforme/éthanol (85/15). L'analyse en CCM indique la présence d'un produit largement majoritaire, révélé par le réactif de Dragendorff sulfurique. Celui-ci est purifié par fixation sur une résine sulfonique en phase H^+ , suivie d'élution par l'ammoniaque diluée. On prépare l'ester méthylique correspondant (diazométhane) qui est chromatographié sur alumine et cristallisé dans l'acétone.

Ce produit, de formule brute $C_{30}H_{45}O_5N_5$ ($SM : M^+ = 555$), présente un point de fusion peu net qui laisse supposer qu'il s'agit d'un mélange d'isomères formés par racémisation en milieu alcalin.

Il correspond à un fragment important de l'alcaloïde, pour lequel est proposée la structure du tétrapeptide, 19, formé par le départ de l'aminophénol, 3.

Il est évident que cette structure ne peut correspondre qu'à la formule 15 pour l'hymenocardine. En effet, dans le cas de la formule 16, le départ de l'aminophénol 3 aurait conduit à deux fragments plus petits.

19

Les spectres I.R., U.V. et de R.M.N. sont en accord avec la structure 19 du tétrapeptide. En effet, le spectre I.R. ne montre pas la bande à 1700cm^{-1} du chafnon aminophénol, tandis que le spectre U.V. présente les trois maximums à λ 222, 283 et 291nm ($\log \epsilon$ 4,75, 3,83 et 3,77) du tryptophane.

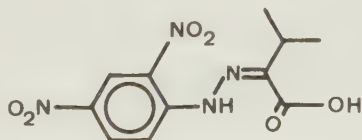
Dans le spectre de R.M.N., un singulet à 2,22ppm est attribuable au groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ de la N-diméthyl-isoleucyl-valine et à 1,70 et 2,00ppm, deux singulets peuvent correspondre aux deux méthyles du chafnon déhydrovaline.

Pour confirmer cette hypothèse de structure, l'ester 19 est dégradé par hydrolyse acide.

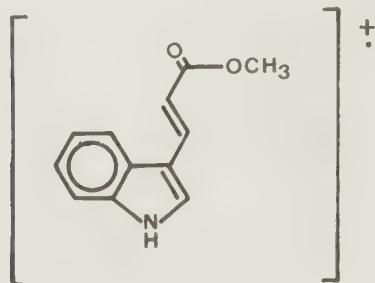
Cette hydrolyse de 19 par HCl 6n à reflux a donné naissance à un acide α -cétonique : l'acide α -céto-isovalérianique, 20, qui peut être formé à partir du chafnon énamide de 19 (17), ainsi qu'au tryptophane et à la N-diméthyl-isoleucyl-valine, tous

20

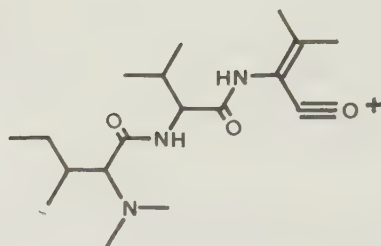
deux racémisés. L'acide α -céto-isovalérianique, 20, est caractérisé sous forme de dinitro-2,4-phénylhydrazone, 21, cristallisée dans l'acétate d'éthyle, $F = 197^\circ$, identique à un échantillon de référence (point de fusion, R_f en CCM, spectre I.R.).

21

Le spectre de masse du tétrapeptide confirme la structure 19, notamment par deux ions à m/e 201 et 338.

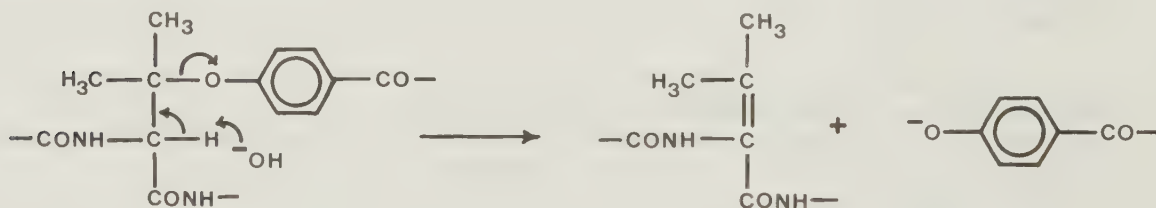


m/e 201



m/e 338

La présence d'une unité déhydro-valine dans 19 peut résulter d'une β -élimination du reste aminophénol, 3, au cours de l'hydrolyse alcaline de l'hymenocardine, selon un mécanisme identique à celui décrit lors de l'étude de la pandamine (17) :

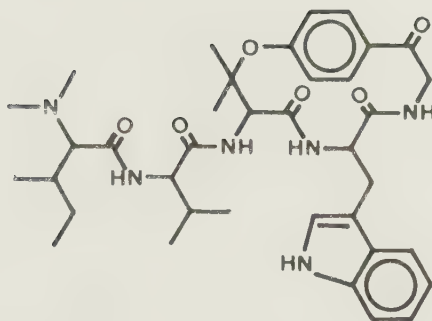


L'établissement de la structure du tétrapeptide 19 élimine la possibilité de la formule 16 pour l'hymenocardine, qui ne peut, dès lors, répondre qu'à la formule 15.

L'hymenocardine présente, comme la pandamine, un cycle à 14 chaînons formé par un aminophénol lié à un acide α -aminé par sa fonction NH_2 et à un acide α -aminé β -hydroxylé par sa fonction phénol.

Les trois éléments constituant ce cycle sont :

- la p-hydroxy- ω -amino-acétophénone
- le tryptophane
- la β -hydroxy-valine.



15

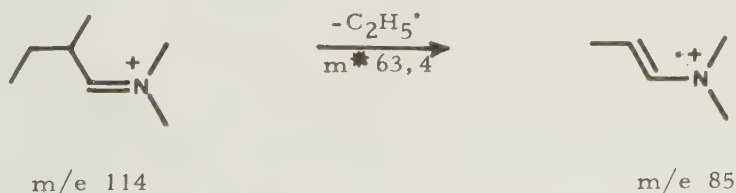
La fonction amine de la β -hydroxy-valine est liée à un dipeptide : la N-diméthyl-isoleucyl-valine. Cette dernière particularité distingue l'hymenocardine de la pandamine, la chaîne latérale de cette dernière étant constituée d'un seul acide α -aminé N-diméthylé : la N-diméthyl-isoleucine. Par contre, elle la rapproche de la scutianine (18), dont la structure était établie au même moment et qui présente également un fragment supplémentaire constitué par la proline dans sa chaîne latérale.

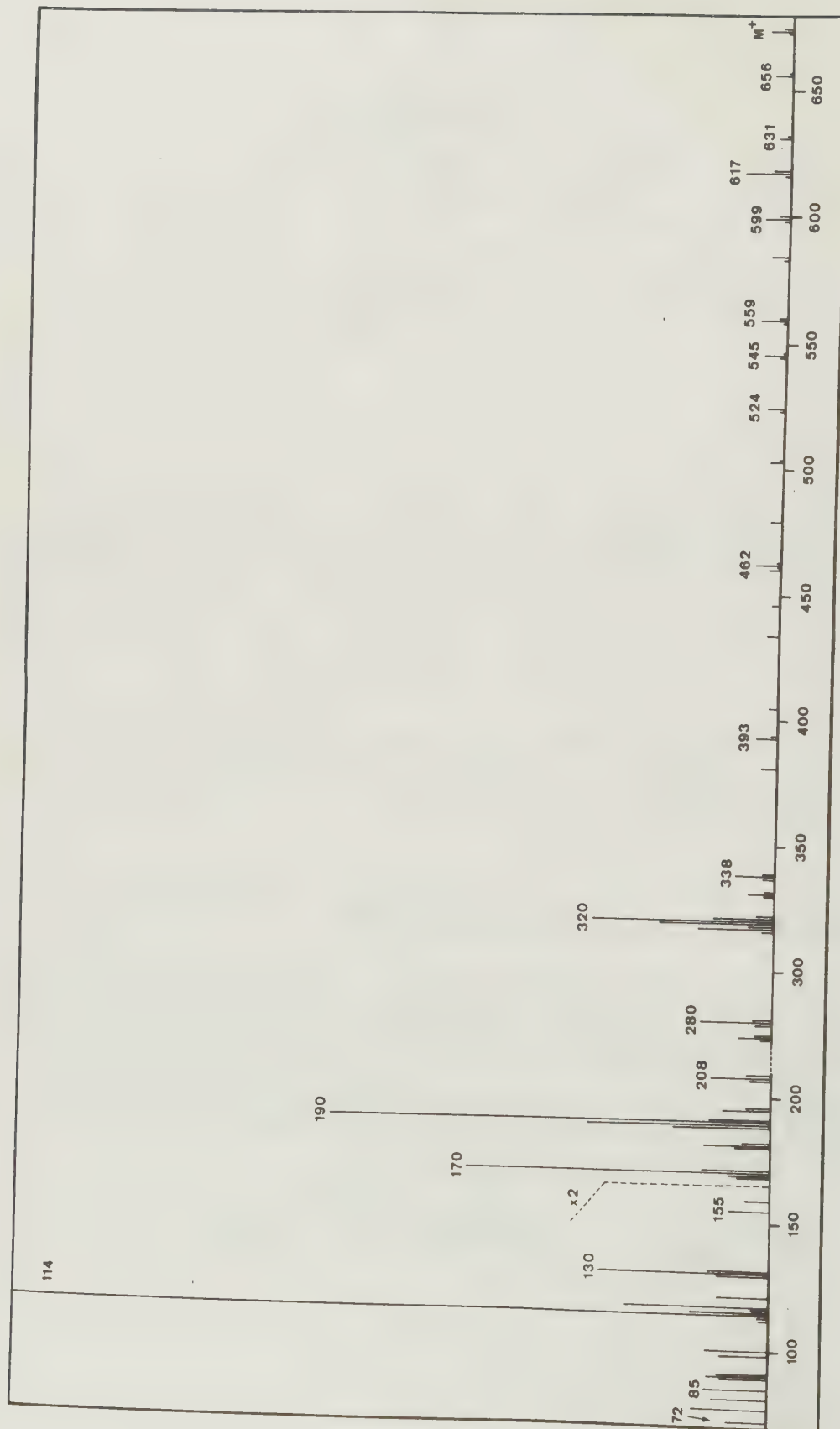
La plus grande originalité structurale de l'hymenocardine est représentée par la β -hydroxy-valine : la jonction du cycle par la fonction éther se faisant au niveau d'un carbone tétrasubstitué, ce qui gouverne la réactivité de cette molécule, en particulier son comportement en spectrométrie de masse.

III SPECTRE DE MASSE DE L'HYMENOCARDINE

Les ions les plus significatifs de ce spectre de masse sont représentés dans le tableau III. L'ion m/e 114, pic de base, correspond au fragment N-diméthyl-isoleucine et résulte d'une rupture en α de l'atome d'azote basique, tandis que l'ion m/e 617, de faible intensité, provient d'une rupture selon β .

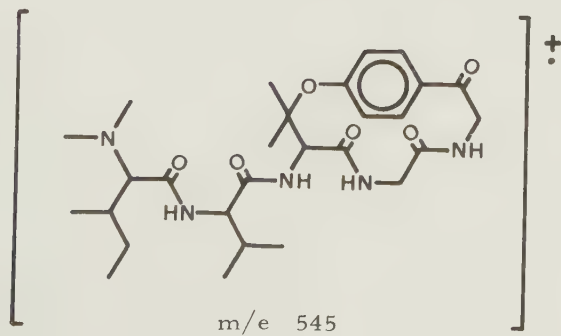
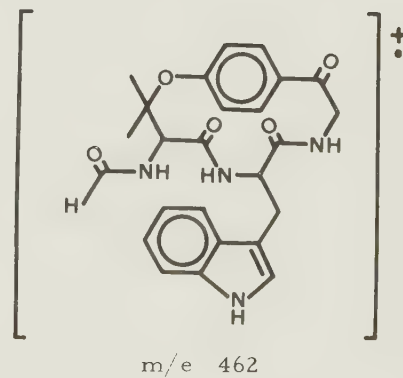
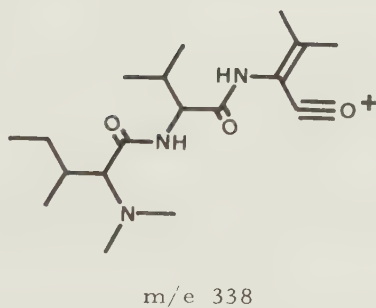
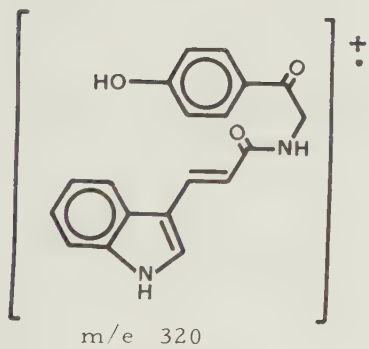
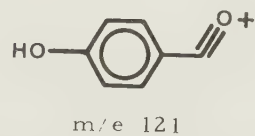
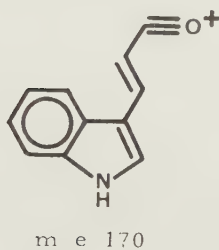
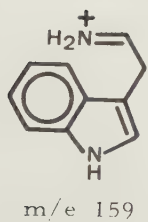
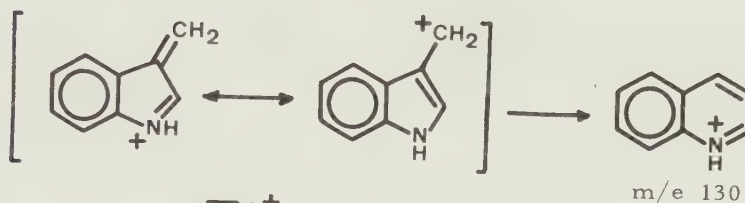
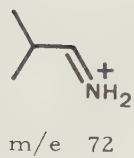
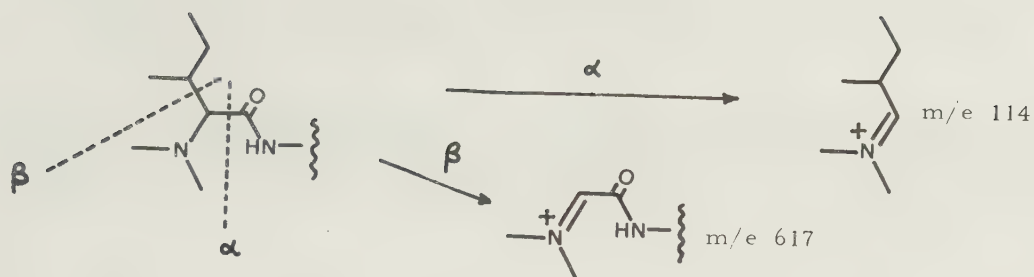
La présence d'un ion m/e 85, formé à partir de l'ion m/e 114, par perte d'un radical éthyl ($m^* 63,4$), indique qu'il s'agit bien d'une N-diméthyl-isoleucine et non d'une N-diméthyl-leucine (19) :





Spectre de masse de l'hymenocardine

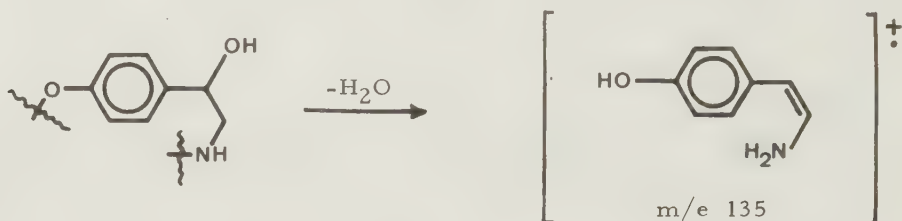
TABLEAU III



L'ion m/e 72 doit correspondre à l'ion "amine" de la valine, cependant il est d'assez faible intensité, ce qui le rend peu significatif dans cette région du spectre.

Les ions intenses m/e 130, 159 et 170, sont caractéristiques du fragment tryptophane, l'ion m/e 130 résultant d'une coupure "indolique".

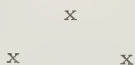
L'ion m/e 121 correspond à la p -hydroxy- α -amino-acétophénone. Dans le spectre de masse des alcools épimères obtenus par réduction de l'hymenocardine, il est remplacé par l'ion m/e 135 résultant d'une dehydration facile de la fonction alcool benzylique.



Les ions de masses plus élevées permettent de relier entre eux certains fragments de l'alcaloïde : l'ion m/e 320 correspond au tryptophane relié à l'aminophénol et l'ion m/e 338 permet de confirmer que la N -diméthyl-isoleucyl-valine est bien reliée à la β -hydroxy-valine. Cet ion m/e 338 résulte d'une rupture thermique de l'éther de phénol, ce qui est vérifié par le fait qu'il est également présent dans le spectre du tétrapeptide, 19.

L'ion m/e 462, accompagné d'un ion m/e 460, représente l'ensemble du cycle et un fragment de la valine, tandis que l'ion m/e 545 ($M-129$) résulte d'une coupure en α de l'azote aminé du tryptophane.

L'interprétation de ce spectre de masse permet donc de confirmer la structure 15 proposée pour l'hymenocardine et établie par dégradation chimique.



Au moment d'aborder l'étude de la lasiodine A, les structures de trois autres alcaloïdes peptidiques très voisins de la pandamine, l'integerressine et l'integerrenine (19), la frangulanine (20), sont publiées. Ces structures sont déduites essentiellement de l'examen des spectres de masse, un schéma commun de fragmentation s'appliquant à ces trois alcaloïdes.

Bien que ce schéma puisse être appliqué également à la pandamine, il ne convient pas à l'étude de l'hymenocardine, vraisemblablement en raison de la présence du tryptophane et d'un chaînon de β -hydroxy-valine. Il n'a pu être utilisé dans le cas de la lasiodine A, dont la structure a dû être établie par dégradation chimique.

==::==::==::==::==::==::==::==::==::==

Chapitre IV

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE LA LASIODINE A

La lasiodine A (21), alcaloïde isolé du Lasiodiscus marmoratus C.H. Wright (Rhamnacées), est obtenue cristallisée dans l'acétone, $F = 195^\circ$, $[\alpha]_D = + 38^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$) et répond à la formule brute $\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{O}_7\text{N}_5$.

I ETUDE SPECTRALE

1) - Spectre I.R. (nujol) -

Il montre une bande à 1750cm^{-1} attribuable à une fonction ester, des bandes à 3220 , 1700 , 1650 et 1515cm^{-1} correspondant à des liaisons peptidiques et une bande à 3300cm^{-1} indiquant la présence d'une ou plusieurs fonctions hydroxylées.

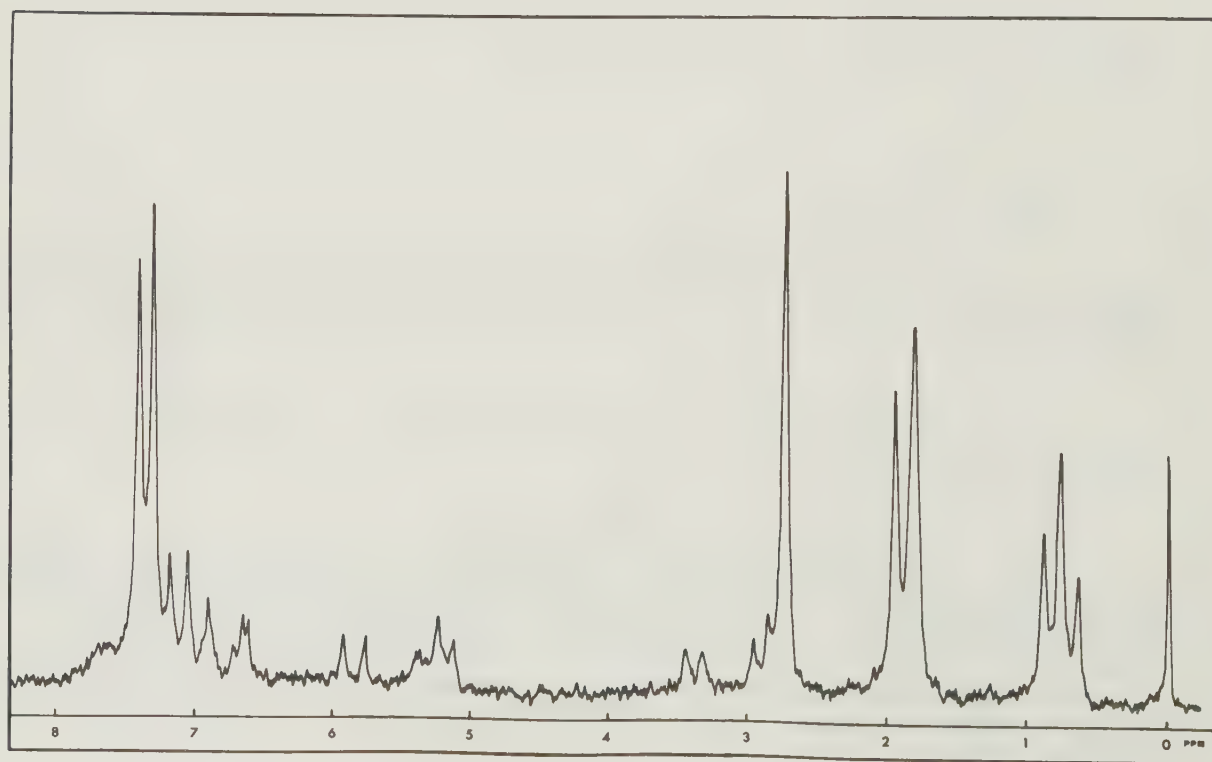
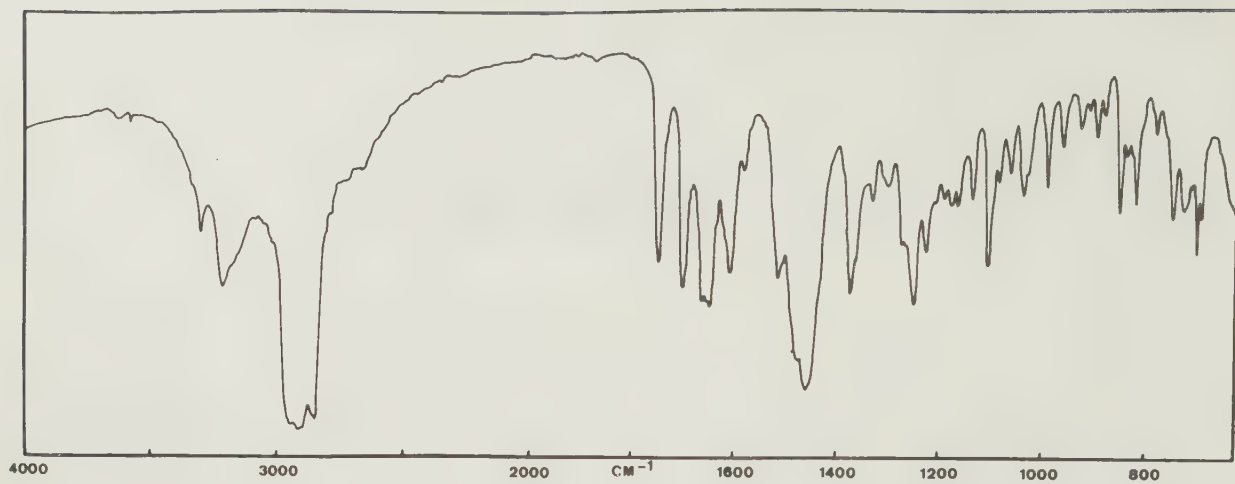
2) - Spectre U.V. -

Il présente une forte absorption terminale de type aromatique, et un maximum accentué à 281nm ($\log \epsilon 4,49$).

3) - Spectre de R.M.N. (CDCl_3) -

Il présente de nombreux signaux dans la région des méthyles aliphatiques et trois singulets à $1,80\text{ppm}$ (6H), $1,93\text{ppm}$ (3H) et $2,73\text{ppm}$ (6H). Après addition d'acide trifluoroacétique, on observe seulement deux singulets à $1,52\text{ppm}$ (3H) et $1,88\text{ppm}$ (3H), tandis qu'apparaît vers 3ppm un pic large correspondant à environ 9 protons.

Le signal à $2,73\text{ppm}$ (6H) et 3 protons du signal à $1,80\text{ppm}$, déplacés vers 3ppm par l'acide trifluoroacétique, sont attribuables respectivement à un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ et à un groupe NCH_3 .



Spectres I. R. et de R. M. N. de la lasiodine A

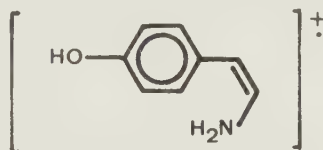
Les 3 autres protons du signal à 1,80ppm et les 3 protons du signal à 1,93ppm, peu déplacés par l'acide trifluoroacétique, peuvent correspondre à deux méthyles portés par un carbone tétrasubstitué.

Dans CDCl_3 , un doublet ($J=9,5\text{Hz}$) à 5,93ppm est attribué à un proton vinylique.

4) - Spectre de masse -

Il ne présente pas de pic moléculaire correspondant à la formule brute, mais seulement un pic M-106 à m/e 593. On observe sur ce spectre quatre pics de grande intensité à m/e 58, 77, 86 et 105-106.

Ce spectre de masse, tout à fait particulier, est nettement différent de ceux de la pandamine et de l'hymenocardine. Il diffère également des spectres des alcaloïdes étudiés par TSCHESCHE (19,20). Seul l'ion à m/e 135 rapproche le spectre de masse de la lasiodine A de ceux d'autres alcaloïdes peptidiques. Il a été décrit dans le cas de la pandamine (17), du produit de réduction de l'hymenocardine (9) et des alcaloïdes étudiés par TSCHESCHE (19,20).



m/e 135

Cet ion, fortement stabilisé par résonance, indique la présence probable dans l'alcaloïde d'un fragment p-hydroxy-styrylamine ou d'une p-hydroxy-phényl-2-hydroxy-2-éthylamine facilement deshydratée.

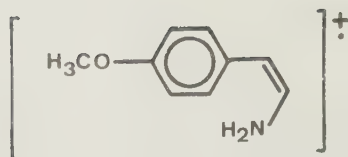
L'étude spectrale de la lasiodine A indique qu'il s'agit d'un alcaloïde peptidique, dont la structure est d'un type différent de celui des alcaloïdes peptidiques étudiés précédemment. Une étude chimique est donc nécessaire pour parvenir à établir la structure de cet alcaloïde.

II ETUDE CHIMIQUE

A - ETUDE FONCTIONNELLE -

1) - Fonction phénol :

La lasiodine A présente une fonction phénol libre, révélée en CCM par une coloration jaune brun avec l'acide p-sulfanilique diazoté. L'alcaloïde traité par le diazométhane conduit à une O-méthyl-lasiodine A cristallisée dans l'acétone, $F = 188^\circ$, $[\alpha]_D = +53^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$) et répondant à la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{O}_7\text{N}_5$. Dans le spectre de masse de ce dérivé, l'ion p-hydroxy-styrylamine, m/e 135, est remplacé par un ion m/e 149.



m/e 149

Ce qui prouve que dans l'alcaloïde, la fonction phénol du fragment aminophénol n'est pas engagée dans une liaison éther.

2) - Fonctions alcool et amine secondaires :

La préparation d'une O,N-diacétyl-O-méthyl-lasiodine A (SM, $M^+ = 797$), indique la présence d'une fonction alcool et d'une fonction amine secondaires dans l'alcaloïde.

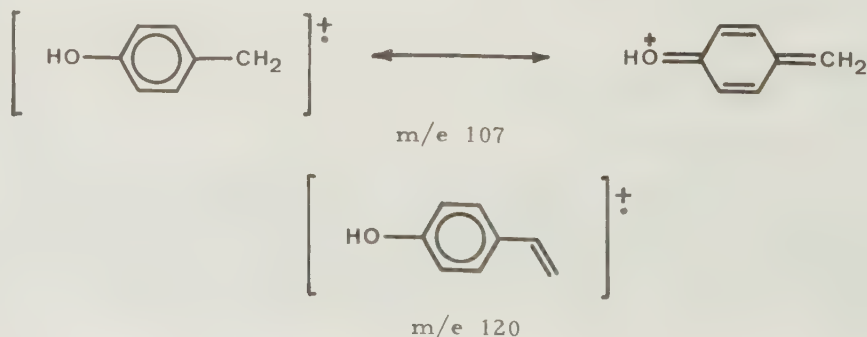
Le spectre de R. M. N. de ce dérivé présente 2 singulets à 1,99 et 2,11ppm de OCOCH_3 et NCOCH_3 , et à 2,88ppm le singulet correspond au NCH_3 d'un groupe NACCH_3 .

La fonction amine secondaire de la lasiodine A est donc une fonction NHCH_3 .

Pour confirmer définitivement que cette fonction est bien présente dans l'alcaloïde et ne résulte pas d'une ouverture éventuelle dans les conditions d'acétylation, la lasiodine A a été méthylée par le formol et l'hydrogène en présence de charbon palladié.

Le dérivé obtenu est cristallisé dans l'éthanol absolu, $F = 144^\circ$, $[\alpha]_D = +39^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), il répond à la formule brute $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{O}_7\text{N}_5$, $1/2 \text{H}_2\text{O}$. Cette formule brute montre que la fonction NHCH_3 a été méthylée, comme le confirme le spectre de R. M. N., et que l'alcaloïde a été en outre dihydrogéné.

Le spectre de masse de la dihydro-N-méthyl-lasiodine A permet d'affirmer que c'est la double liaison d'une p-hydroxy-styrylamine qui a été hydrogénée : l'ion m/e 135 est remplacé par les ions m/e 107 et m/e 120 caractéristiques de la tyramine (19).



Alors que le spectre U.V. de la lasiodine A est caractérisé par un maximum intense à 281nm, on observe dans celui de la dihydro-N-méthyl-lasiodine A un épaulement à 225nm ($\log \epsilon$ 4,62) et deux maximums à 278 et 286nm ($\log \epsilon$ 3,64 et 3,55) comparables à ceux du spectre U.V. de la N-acétyl-tyramine.

L'absorption à 281nm dans le spectre U.V. de la lasiodine A doit donc être attribuée à une p-hydroxy-styrylamine non engagée dans un système cyclique.

Le doublet à 5,93ppm, observé dans le spectre de R.M.N. de la lasiodine A, disparaît dans celui de la dihydro-N-méthyl-lasiodine A, ce qui prouve qu'il correspondait à l'un des protons vinyliques de la p-hydroxy-styrylamine. La constante de couplage de ce doublet ($J=9,5\text{Hz}$) indique qu'il s'agit d'une cis-p-hydroxy-styrylamine (22). Un résultat identique a été observé dans le cas de la zizyphine (5), de la céanothine B (6) et de la scutianine (18).

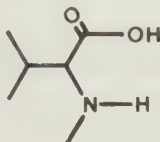
3) - Fonction ester :

L'hydrolyse alcaline ($\text{NaOH } 0,5 \text{ n}$ à 20°) de la lasiodine A conduit à un acide aminé et à un produit basique. Cette réaction confirme la présence d'un groupe ester dans l'alcaloïde (I.R. : 1750cm^{-1}) et permet d'éliminer la possibilité d'une fonction lactone.

● L'acide aminé est caractérisé sous forme de chlorhydrate cristallisé dans le mélange méthanol/acétone.

Le spectre de R.M.N. (D_2O) de ce chlorhydrate présente deux doublets ($J=7\text{Hz}$) de 3 protons à 0,91 et 0,94ppm pouvant être attribués aux deux méthyles d'un groupe isopropyle et à 2,61ppm un singulet de 3 protons d'un groupe NCH_3 . Le doublet ($J=4,5\text{Hz}$) à 3,30ppm peut être considéré comme le signal de l'hydrogène en α du groupe NCH_3 .

L'interprétation de ce spectre permet de proposer pour cet acide aminé la structure d'une N-méthyl-valine, 22.



22

Le spectre I.R. et le pouvoir rotatoire du chlorhydrate de 22, $[\alpha]_D = +33^\circ$ ($\text{HCl } 6 \text{ n}$, $c = 1$), identiques à ceux d'un échantillon de référence, confirment que cet acide aminé a bien la structure d'une N-méthyl-L-valine (23).

Le produit basique, révélé en CCM par le réactif de Draggendorf sulfurique, est cristallisé dans l'acétone, $F = 217^\circ$, $[\alpha]_D = +123^\circ$ ($\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH } 1/1$, $c = 1$), il répond à la formule brute $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{N}_4$ (SM, M-106 à m/e 462). Ce produit correspond non pas à l'alcool qui aurait dû être obtenu par hydrolyse de la fonction ester, mais à son produit de deshydratation et sa structure sera étudiée et discutée plus loin.

L'hydrolyse alcaline de la lasiodine A a donc permis de montrer que cet alcaloïde possède une fonction ester dont le fragment acide est constitué par la N-méthyl-valine.

4) - Hydrogénation catalytique :

L'hydrolyse acide d'un alcaloïde peptidique renfermant une unité de p-hydroxy-styrylamine ne donnant pas de bons résultats, il est apparu préférable d'effectuer cette dégradation sur un dérivé hydrogéné comportant une unité de tyramine.

L'hydrogénation catalytique de la lasiodine A (H_2 , C/Pd) conduit à deux produits :

- L'un d'eux, révélé en CCM par la ninhydrine et purifié par sublimation, est identifié à la N-méthyl-L-valine, obtenue par hydrogénolyse de la fonction ester.
- Le produit principal, cristallisé dans l'acétone, $F = 186^\circ$, $[\alpha]_D = + 25^\circ$ ($CHCl_3/CH_3OH$ 1/1, $c = 1$), répond à la formule brute $C_{33}H_{42}O_5N_4$. Cette formule indique l'hydrogénation de deux doubles liaisons et l'hydrogénolyse réductrice de la fonction ester.

Le spectre U.V., caractéristique d'un dérivé de la tyramine, ainsi que les ions à m/e 107 et m/e 120 dans le spectre de masse, montrent que la double liaison de la p-hydroxy-styrylamine a bien été hydrogénée.

On note, d'autre part, dans le spectre de R.M.N. du produit d'hydrogénolyse, la disparition des 2 singulets attribués dans le spectre de l'alcaloïde à deux méthyles portés par un carbone tétrasubstitué.

La structure de ce produit d'hydrogénolyse a été établie par dégradation chimique.

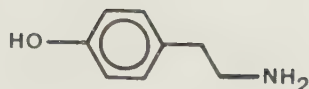
B - ETUDE PAR DEGRADATION -

1) - Hydrolyse acide du dérivé d'hydrogénolyse, 23a : Après hydrolyse acide dans les conditions habituelles ($HCl/CH_3COOH/H_2O$ 2/1/1) pendant 5 heures, l'analyse en CCM de l'hydrolysate indique la présence de trois produits, deux d'entre eux étant révélés par la ninhydrine et le troisième par le réactif de Dragendorff sulfurique.

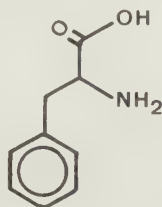
L'hydrolysate est purifié sur une résine sulfonique en phase H^+ , puis passé sur une résine carboxylique en phase H^+ qui fixe le produit le plus basique.

• Etude du produit retenu par la résine. Après élution par l'ammoniaque diluée, le produit est chromatographié et cristallisé dans l'éthanol absolu, $F = 162^\circ$. Le R_f en CCM, le point de fusion et le spectre I.R. de ce produit sont identiques à ceux d'un échantillon de référence de p-tyramine, 24.

La p-tyramine, 24, obtenue après hydrolyse de 23a, provient de l'unité p-hydroxy-styrylamine postulée dans la lasiodine A.

24

• Séparation et étude des produits non fixés par la résine. Ces produits amphotères sont séparés par chromatographie sur silice. Le premier produit élué par un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (85/15) est un acide aminé qui est identifié à la phénylalanine, 25 (Rf en CCM, spectre I.R.).

25

Le pouvoir rotatoire de 25, $[\alpha]_D = + 32^\circ$ (H_2O , $c = 1$), indique qu'il s'agit de la D-phénylalanine, premier acide aminé de la série D, isolé à partir des alcalotides peptidiques. Cette unité de D-phénylalanine pouvant résulter de l'hydrogénolyse de l'ester d'une phénylsérine, la configuration initiale de ce fragment dans l'alcalotide sera démontrée ultérieurement.

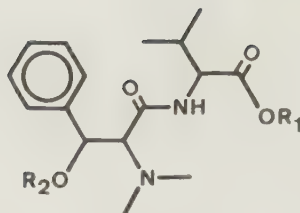
Le second produit, 26a, révélé par le réactif de Dragendorff sulfurique est élué par un mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90/10) et purifié sous forme d'ester 26b.

Le spectre I.R. (CHCl_3) de 26b présente une bande à 3350cm^{-1} , attribuable à une fonction hydroxylée et des bandes amides à 1700 , 1650 et 1510cm^{-1} , indiquant qu'il s'agit d'un peptide.

Le spectre de R.M.N. (CDCl_3) présente deux doublets ($J=6,5\text{Hz}$) à $0,91$ et $0,94\text{ppm}$ attribuables aux deux méthyles d'un groupe isopropyle, à $2,29\text{ppm}$ le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ et à $3,36\text{ppm}$ le doublet ($J=6\text{Hz}$) du proton en α du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Un pic large à $4,15\text{ppm}$ peut être attribué à un OH et le doublet ($J=6\text{Hz}$) à $5,04\text{ppm}$ peut correspondre à un hydrogène en α de l'OH. Entre $7,20$ et $7,40\text{ppm}$ apparaissent 6 protons aromatiques et amidiques et à $3,71\text{ppm}$ le singulet du COOCH_3 .

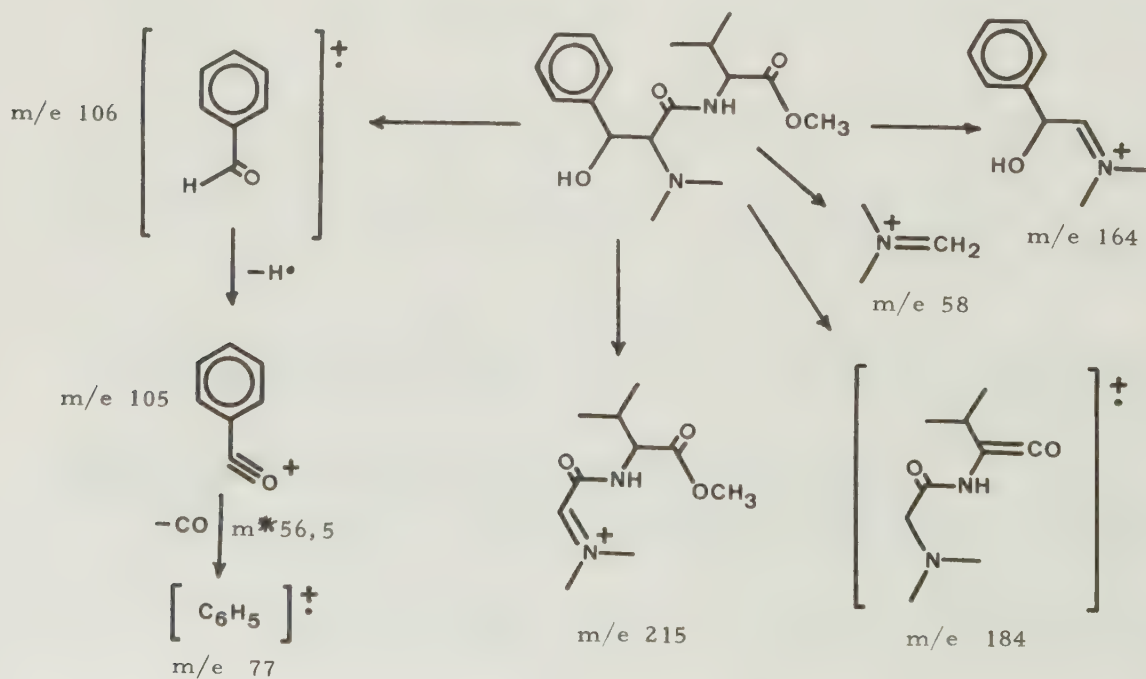
L'examen des spectres I.R. et de R.M.N. de l'ester 26b permet de proposer pour 26a la structure d'une N-diméthyl- β -phénylséryl-valine.



<u>26</u>	<u>a</u>	$R_1=R_2=H$
	<u>b</u>	$R_1=CH_3$; $R_2=H$
	<u>c</u>	$R_1=CH_3$; $R_2=COCH_3$

La présence d'une fonction alcool secondaire dans 26a est confirmée par acétylation de l'ester 26b. Le dérivé 26c obtenu présente dans son spectre de R.M.N. le singulet du groupe $OCOCH_3$ à 2,08ppm et le doublet ($J=5,7Hz$) de l'hydrogène en α du $OCOCH_3$ à 6,17ppm.

L'examen du spectre de masse de 26b confirme la structure proposée ; on n'observe pas de pic moléculaire et les ions les plus intenses sont représentés dans le schéma suivant :

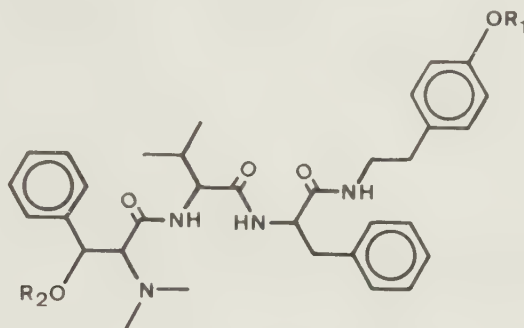


L'hydrolyse acide du dérivé d'hydrogénolyse 23a a donc permis d'identifier ses trois fragments constitutifs :

- p-tyramine, 24
- D-phénylalanine, 25
- N-diméthyl- β -phénylséryl-valine, 26a.

Comme dans le cas de l'hymenocardine, l'encombrement stérique important créé par la chaîne latérale de la valine a empêché l'hydrolyse de la liaison peptidique unissant la N-diméthyl- β -phénylsérine à la valine (15).

En admettant que le dérivé d'hydrogénolyse, 23a, possède une fonction phénol et une fonction alcool secondaire libres, il ne reste qu'un seul enchaînement possible pour ces trois fragments, ce qui permet de proposer pour 23a la structure suivante :



<u>23</u>	<u>a</u>	$R_1=R_2=H$
	<u>b</u>	$R_1=CH_3$; $R_2=H$
	<u>c</u>	$R_1=CH_3$; $R_2=COCH_3$

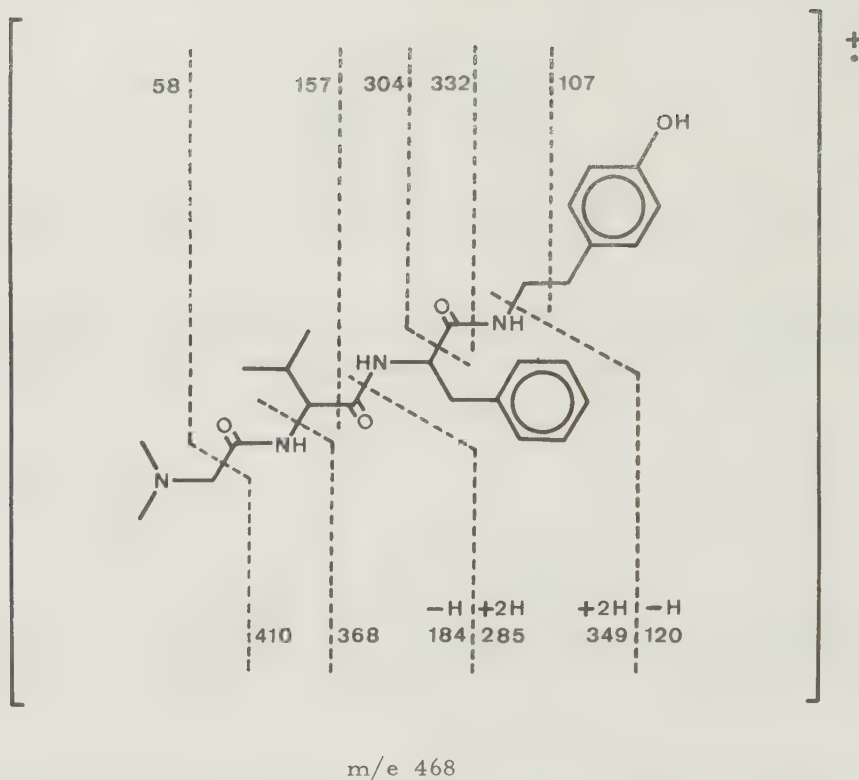
La présence d'une fonction phénol et d'une fonction alcool secondaire libres dans 23a a été démontrée par l'obtention d'un dérivé O-méthylé, 23b, et d'un dérivé O-méthylé-O-acétylé, 23c.

Le spectre de masse de 23b présente un pic à m/e 134 prouvant que c'est l'hydroxyle phénolique de la tyramine qui a été méthylé ($120 + 14$). Le spectre de R.M.N. de 23c présente à 2,03ppm le singulet du groupe $OCOCH_3$ et à 6,13ppm le doublet ($J=5,5Hz$) de l'hydrogène en α du $OCOCH_3$.

Les spectres U.V., I.R. et de R.M.N. de 23a sont parfaitement en accord avec la structure proposée, celle-ci est confirmée par l'examen du spectre de masse.

Comme celui de 26b, ce spectre ne présente pas de pic moléculaire, mais un pic M-106 à m/e 468, résultant d'une fragmentation très favorisée du même type que celle conduisant à l'ion m/e 215, et avec transfert d'hydrogène.

Les fragmentations successives de l'ion m/e 468 donnent naissance aux autres ions observés sur le spectre :



La structure du dérivé d'hydrogénolyse 23a étant démontrée, il devient possible d'établir une corrélation entre celui-ci et le produit résultant d'une deshydratation de l'alcool libéré par saponification de la fonction ester de la lasiodine A. On peut penser, en effet, que la structure de ce produit saponifié et deshydraté, qui n'avait pu être établie lors de son isolement, doit être proche de celle de 23a, puisque ces deux molécules résultent d'une perte du chafnon N-méthyl-valine. L'étude spectrale et fonctionnelle du dérivé saponifié et deshydraté, 27a, comparée à celle de 23a, confirme cette hypothèse.

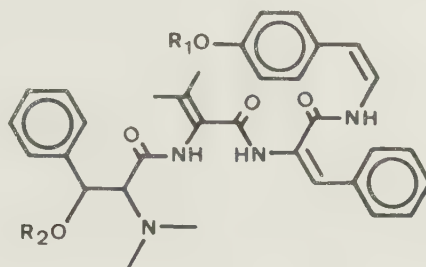
Le spectre de R.M.N. (CDCl_3) de 27a présente à 2,23ppm le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ et à 5,71ppm un doublet ($J = 9,5\text{Hz}$) attribuable à l'un des protons vinyliques de la p-hydroxy-styrylamine.

Le dérivé 27a possède une fonction phénol libre et donne un dérivé O-méthylé, 27b : le spectre de masse de 27b indique que c'est la fonction phénol de la p-hydroxy-styrylamine qui a été méthylée (pic à m/e 149). L'acétylation de 27b révèle la présence d'une fonction alcool secondaire dans 27a. Le spectre de R.M.N. du dérivé 27c obtenu montre le singulet du groupe OCOCH_3 à 1,94ppm et le doublet ($J = 5,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du OCOCH_3 à 6,11ppm.

Le spectre de masse de 27a indique que ce dérivé renferme un fragment N-di-méthyl- β -phénylsérine (ions m/e 58, 77, 105-106 déjà observés dans le spectre de 23a).

En outre, l'examen comparé du spectre de masse et de la formule brute de 27a permet d'affirmer que ce dérivé diffère de 23a par la seule présence de trois doubles liaisons.

L'une de ces doubles liaisons étant obligatoirement celle de la p-hydroxy-styrylamine, il n'existe qu'une seule possibilité de placer les deux autres et la structure suivante peut être proposée pour 27a :



<u>27</u>	<u>a</u>	$R_1 = R_2 = H$
	<u>b</u>	$R_1 = CH_3 ; R_2 = H$
	<u>c</u>	$R_1 = CH_3 ; R_2 = COCH_3$

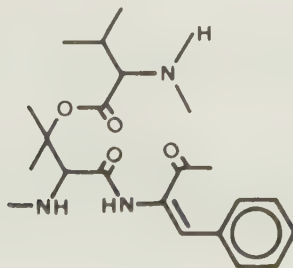
La présence d'une unité de déhydro-valine dans 27a est confirmée par le spectre de R.M.N. qui présente deux singulets à 1,76 et 2,02ppm, attribuables aux deux méthyles portés par un carbone tétrasubstitué.

Le spectre U.V. de 27a, caractérisé par une forte absorption entre 270 et 295nm ($\log \epsilon$ 4,61), s'explique par la présence d'une seconde unité de styrylamide correspondant à une déhydro-phénylalanine.

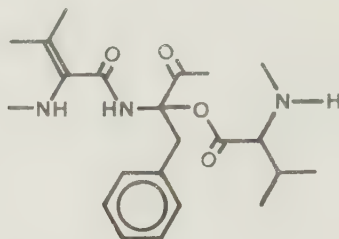
L'obtention du dérivé 27a, à partir de la lasiodine A, résulte donc de la deshydratation de la fonction alcool libérée par saponification.

Pour établir la structure de l'alcaloïde, il reste donc à déterminer la position de la fonction alcool initialement estérifiée, ou celle de la double liaison. Il existe, en effet, trois possibilités :

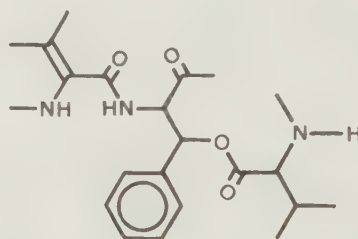
- ① - Ester d'une β -hydroxy-valine, la double liaison est alors celle de la déhydro-phénylalanine.



- ② - Ester d'une α -hydroxy-phénylalanine, la double liaison devient celle de la déhydro-valine.



- ③ - Ester d'une β -phénylsérine, la double liaison est toujours celle de la déhydro-valine.



L'hypothèse ① peut être écartée a priori, car la lasiodine A devrait présenter alors un spectre U. V. identique à celui de 27a, ce qui n'est pas le cas.

Pour permettre de choisir entre les hypothèses ② et ③, il suffit d'étudier la fonction alcool d'un dérivé obtenu par coupure de la fonction ester de l'alcaloïde sans deshydratation. En effet, dans l'hypothèse ②, la fonction alcool estérifiée est tertiaire, tandis qu'elle est secondaire dans l'hypothèse ③.

Cette coupure de la fonction ester, sans deshydratation de l'alcool libéré, a été réalisée par action de l'hydruure de lithium aluminium sur la lasiodine A.

2) - Traitement de la lasiodine A par LiAlH_4 : La lasiodine A, traitée par LiAlH_4 à température ordinaire, conduit à un dérivé purifié par chromatographie sur silice.

Le spectre I. R. de ce dérivé, 28a, présente des bandes OH à 3400 et 3300 cm^{-1} . Son spectre U. V. est identique à celui de la lasiodine A, ce qui indique qu'il y a eu simple coupure de la fonction ester, sans deshydratation.

Le spectre de masse confirme ce résultat : il présente un pic M-106 à m/e 480, accompagné d'un ion à m/e 462 (480-18). Par action du diazométhane, 28a conduit à un dérivé O-méthylé, 28b. L'acétylation de ce dernier fournit un dérivé 28c dont le spectre de masse ($M^+ = 684$) prouve qu'il s'agit d'un produit O-méthylé et O-diacétylé; 28a renfermerait ainsi deux fonctions alcool acétylables.

La comparaison des spectres de R.M.N. des dérivés 28b et 28c permet de démontrer que la fonction alcool libérée par coupure de l'ester est secondaire.

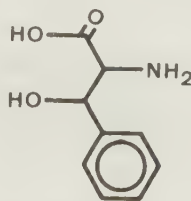
Le spectre de R.M.N. ($CDCl_3$) de 28b présente, en effet, deux doublets correspondant à un proton chacun : l'un à 4,83ppm ($J=6,5\text{Hz}$), l'autre à 5,38ppm ($J=4\text{Hz}$). Ces deux signaux attribuables à deux hydrogènes en α d'hydroxyles sont déplacés respectivement à 6,08ppm ($J=5,5\text{Hz}$) et 6,26ppm ($J=6\text{Hz}$), dans le spectre du dérivé O-diacétylé 28c, où ils correspondent à deux hydrogènes en α de groupes $OCOCH_3$.

Les différences de couplage observées (1 et 2 Hz) dans les signaux des dérivés OH et OAc, sont vraisemblablement dues à une différence de conformation attribuable à l'encombrement stérique supplémentaire apporté par les groupes acétyles.

Afin de confirmer que la fonction alcool libérée est bien secondaire et correspond à un fragment β -phénylsérine, le dérivé 28a est dégradé par hydrolyse acide. Celle-ci va permettre, en outre, d'étudier la configuration absolue des éléments ainsi isolés.

3) - Hydrolyse acide de 28a : Après hydrolyse de 28a dans les conditions habituelles ($HCl/CH_3COOH/H_2O \text{ } 2/1/1$), on isole un acide aminé révélé par la ninhydrine et un autre produit révélé par le réactif de Dragendorff sulfurique.

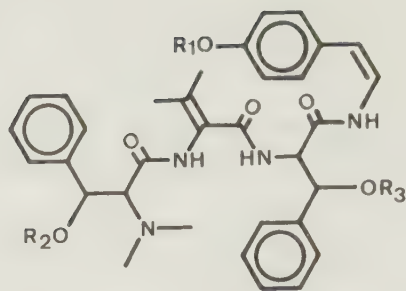
a) - L'acide aminé, cristallisé dans l'éthanol absolu, $[\alpha]_D = +29^\circ$ (H_2O , $c = 1$), est identifié à la D-thréo- β -phénylsérine, 29 (Rf en CCM, spectre I.R., pouvoir rotatoire) (24).



29

Ce résultat permet d'attribuer définitivement au dérivé résultant de la coupure de la fonction ester de la lasiodine A, sans deshydratation, la structure 28a.

L'identification de 28a à un produit obtenu en faibles quantités à côté de 27a, lors de l'hydrolyse alcaline douce de la lasiodine A, permet d'affirmer que le traitement de l'alcaloïde par $LiAlH_4$ n'a pas modifié la configuration absolue du carbone porteur de la fonction ester. Par conséquent, dans la lasiodine A, le fragment β -phénylsérine a bien une configuration thréo.



<u>28</u>	<u>a</u>	$R_1=R_2=R_3=H$
	<u>b</u>	$R_1=CH_3 ; R_2=R_3=H$
	<u>c</u>	$R_1=CH_3 ; R_2=R_3=COCH_3$

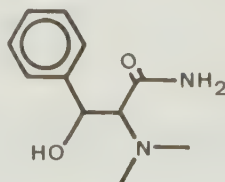
D'autre part, l'obtention stéréospécifique de cette D-thréo- β -phénylsérine, 29, confirme la configuration absolue du carbone α de cet élément : celle-ci avait été établie après l'isolement de D-phénylalanine, 25, obtenue par hydrolyse acide du dérivé d'hydrogénolyse, 23a.

b) - Le second produit, issu de l'hydrolyse acide de 28a, est purifié par sublimation, $F = 105^\circ$, $[\alpha]_D = +26^\circ$ ($CHCl_3$, $c = 1$), il répond à la formule brute $C_{11}H_{16}O_2N_2$.

Le spectre I.R. ($CHCl_3$) de ce produit présente des bandes à 3370 et $1670cm^{-1}$ attribuables à une fonction amide primaire.

Le spectre de R.M.N. ($CDCl_3$) présente un singulet à $2,28ppm$ d'un groupe $N(CH_3)_2$, à $4,01ppm$ un pic large pouvant correspondre à un OH et à $7,38ppm$ un singulet attribuable à 5 protons aromatiques. A $3,29$ et $5,06ppm$, deux doublets ($J=6,5Hz$) peuvent être attribués aux deux hydrogènes en α du groupe $N(CH_3)_2$ et de l'OH, couplant mutuellement.

L'examen comparé de la formule brute et des spectres I.R. et de R.M.N. de ce produit permet de lui attribuer la structure d'un N-diméthyl- β -phénylsérinamide, 30.

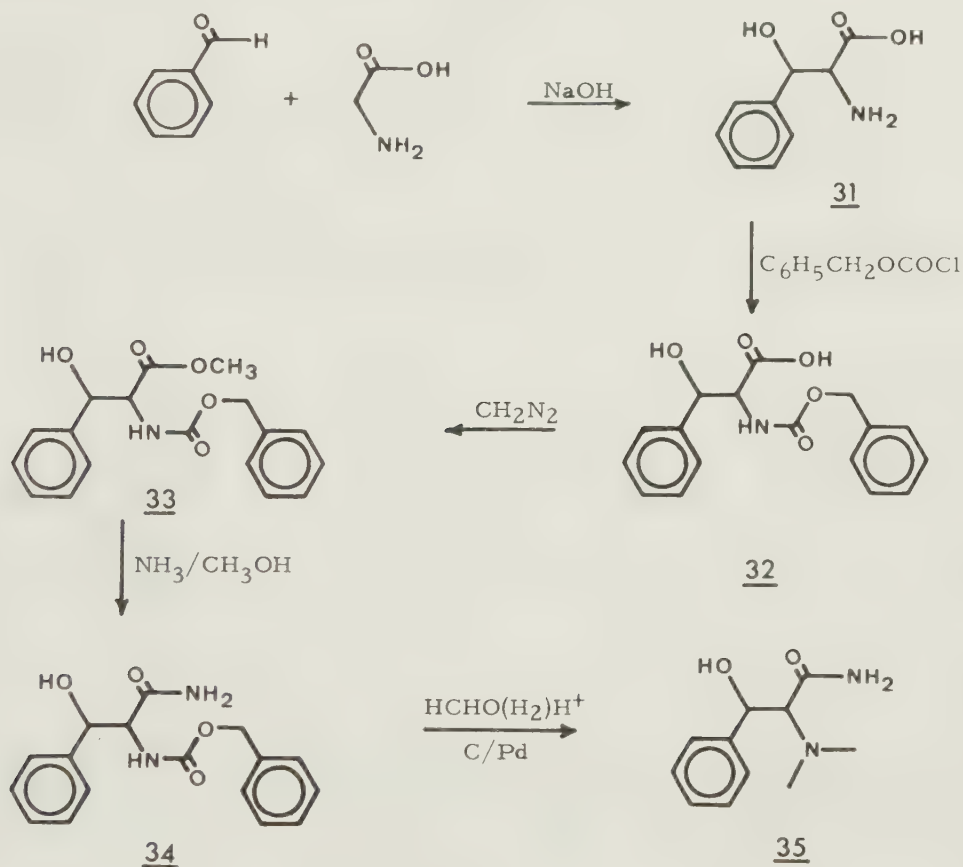


30

Cette structure est confirmée par le spectre de masse qui présente des ions déjà observés dans le spectre de l'ester de la N-diméthyl- β -phénylséryl-valine, 26b.

L'obtention de cet amide correspond à l'hydrolyse du groupe énamide formé par liaison peptidique entre la N-diméthyl- β -phénylsérine et la déhydro-valine dans 28a.

La synthèse stéréospécifique du N-diméthyl- β -phénylsérinamide, 30, effectuée à partir des diastéréoisomères de la β -phénylsérine, a permis d'établir sa configuration absolue. Cette synthèse a été réalisée tout d'abord sur les diastéréoisomères racémiques DL-thréo- et DL-erythro, selon le schéma suivant :



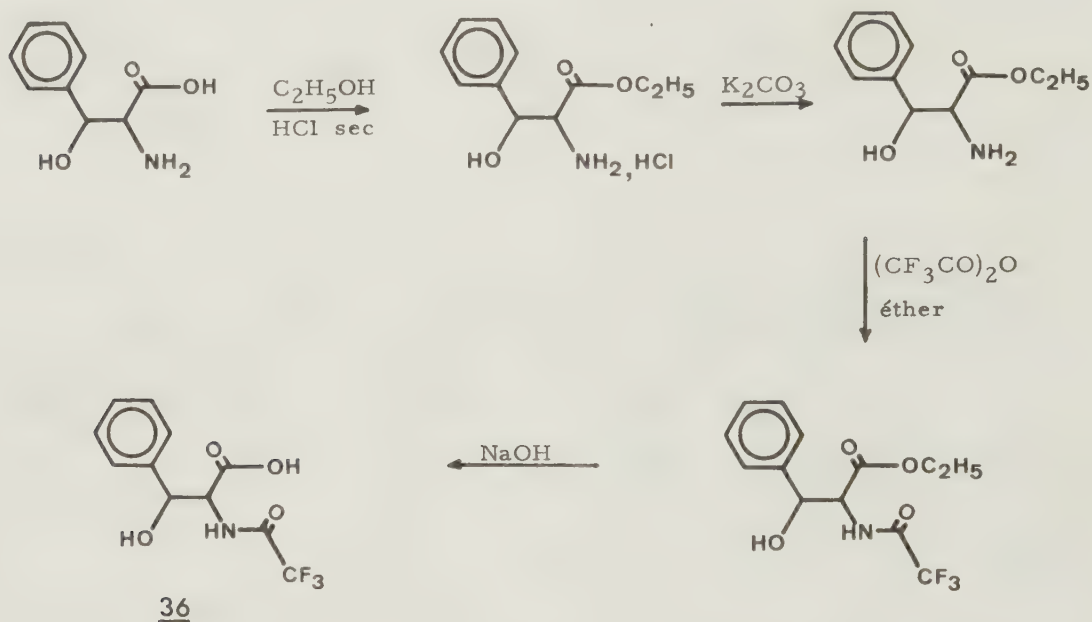
La condensation du glycolle avec le benzaldéhyde en milieu alcalin conduit à un mélange de DL-thréo et DL-erythro- β -phénylsérines, 31, que l'on sépare par cristallisation fractionnée (25).

L'amidification du carboxyle préalablement estérifié n'a pu être réalisée quantitativement, ni à partir de 31 à fonction NH_2 libre, ni à partir de son dérivé N-diméthylé. Afin d'obtenir de meilleurs rendements, la protection de la fonction amine a donc été effectuée (26), elle conduit à la N-benzyloxycarbonyl-phénylsérine, 32, estérifiée ensuite par le diazométhane.

L'amide 34, obtenu en traitant l'ester 33 par le méthanol ammoniacal, est hydrogénolysé et N-diméthylé en une seule étape par hydrogénation catalytique (C/Pd) en présence de formol et d'acide acétique.

Les spectres I.R. et de R.M.N. du dérivé DL-erythro, 35, ainsi synthétisé, s'étant montrés identiques à ceux de l'amide naturel, 30, le dédoublement de la DL-erythro- β -phénylsérine a été entrepris.

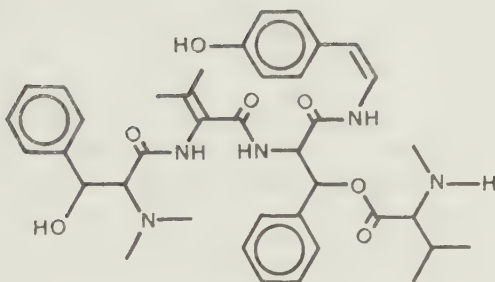
Ce dédoublement est réalisé par la carboxypeptidase pancréatique, qui hydrolyse sélectivement la N-trifluoroacétyl-DL-erythro- β -phénylsérine en donnant la L-erythro- β -phénylsérine (27). La N-trifluoroacétyl-DL-erythro- β -phénylsérine, 36, est préparée selon le schéma :



Le pouvoir rotatoire du N-diméthyl-L-erythro- β -phénylsérinamide, synthétisé stéréospécifiquement à partir de la L-erythro- β -phénylsérine, s'étant révélé identique à celui de l'amide naturel, 30, l'élément N-diméthyl- β -phénylsérine de la lasiodine A a donc la configuration L-erythro.

Les deux acides α -aminés- β -hydroxylés de cet alcaloïde ont ainsi deux carbones α de configuration opposée et deux carbones β de même configuration.

L'étude de la structure du dérivé 28a a donc permis d'établir la configuration absolue de quatre carbones de l'alcaloïde, et de démontrer que la fonction ester est située sur le fragment β -phénylsérine, ce qui confère à la lasiodine A la structure 37.



37

La lasiodine A est donc un alcaloïde peptidique nouveau, qui possède certaines analogies structurales avec les alcaloïdes peptidiques décrits précédemment (1, 9, 18, 19 et 20) :

- présence d'un N-diméthyl acide aminé terminal ;
- présence d'un aminophénol ;
- présence d'un acide α aminé β hydroxylé.

Cependant, la lasiodine A est un alcaloïde peptidique original à divers titres :

. C'est le premier alcaloïde peptidique "ouvert" ; il ne présente pas le cycle à 14 chaînons des alcaloïdes précédents, formé par étherification entre l'OH de l'aminophénol et celui de l'acide α aminé β hydroxylé, mais il en possède néanmoins les éléments.

. Cet alcaloïde renferme deux acides α aminés β hydroxylés, l'un est en même temps le N-diméthyl acide aminé terminal, tandis que l'autre a sa fonction alcool esterifiée. La lasiodine A possède, en effet, la particularité qui semble n'avoir jamais été mise en évidence dans un produit naturel, de comporter un acide aminé N-méthylé (la N-méthyl-valine) dont la fonction amine est libre, et la fonction carboxylique engagée dans une liaison ester avec un acide α aminé β hydroxylé. Ce type d'ester particulier est très facilement hydrolysable et entraîne une certaine instabilité de l'alcaloïde.

. En outre, la lasiodine A renferme un déhydro-acide aminé : la déhydro-valine.

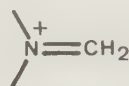
Ces particularités structurales gouvernent le comportement et la réactivité de cette molécule, notamment en spectrométrie de masse ; c'est pourquoi le spectre de masse de la lasiodine A n'a pu être interprété qu'à la suite de la détermination de la structure.

III SPECTRE DE MASSE DE LA LASIODINE A

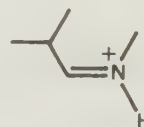
Il a déjà été noté que ce spectre tout à fait particulier n'avait pu être rationalisé par le schéma de fragmentation proposé par TSCHESCHE (19) et que seul un ion à m/e 135 pouvait correspondre à ce schéma.

Ce qui caractérise ce spectre, c'est essentiellement la présence de quatre pics de grande intensité à m/e 58, 77, 86 et 105-106, alors que les alcaloïdes décrits précédemment (1, 9, 18, 19 et 20) ne montraient qu'un seul pic très intense. Comme dans le cas des dérivés 23a et 26b, on n'observe pas de pic moléculaire. La fragmentation très favorisée entre les carbones portant les groupes $N(CH_3)_2$ et OH de la N-diméthyl- β -phénylsérine conduit à un ion M-106 à m/e 593 et à l'ion intense m/e 106, ainsi qu'aux deux ions également très intenses m/e 105 et m/e 77, qui dérivent de l'ion m/e 106 (28a).

L'ion m/e 86 provient de la fragmentation en α de l'atome d'azote basique de la N-méthyl-valine ; quant à l'ion m/e 58, il résulte, après formation de l'ion m/e 593, de la coupure en α du groupe $N(CH_3)_2$ basique terminal.

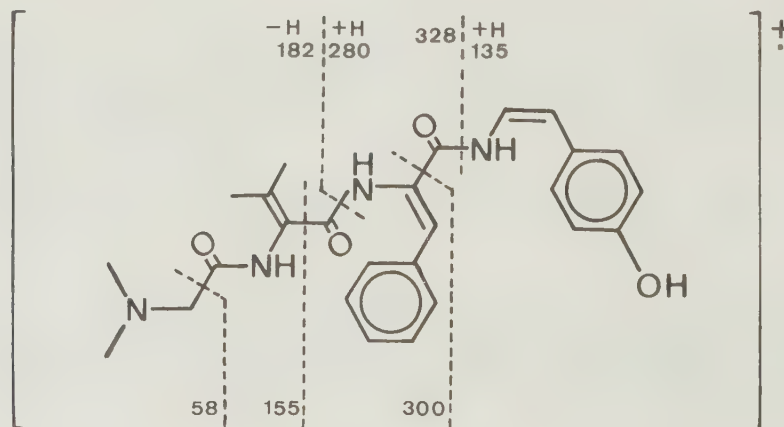


m/e 58

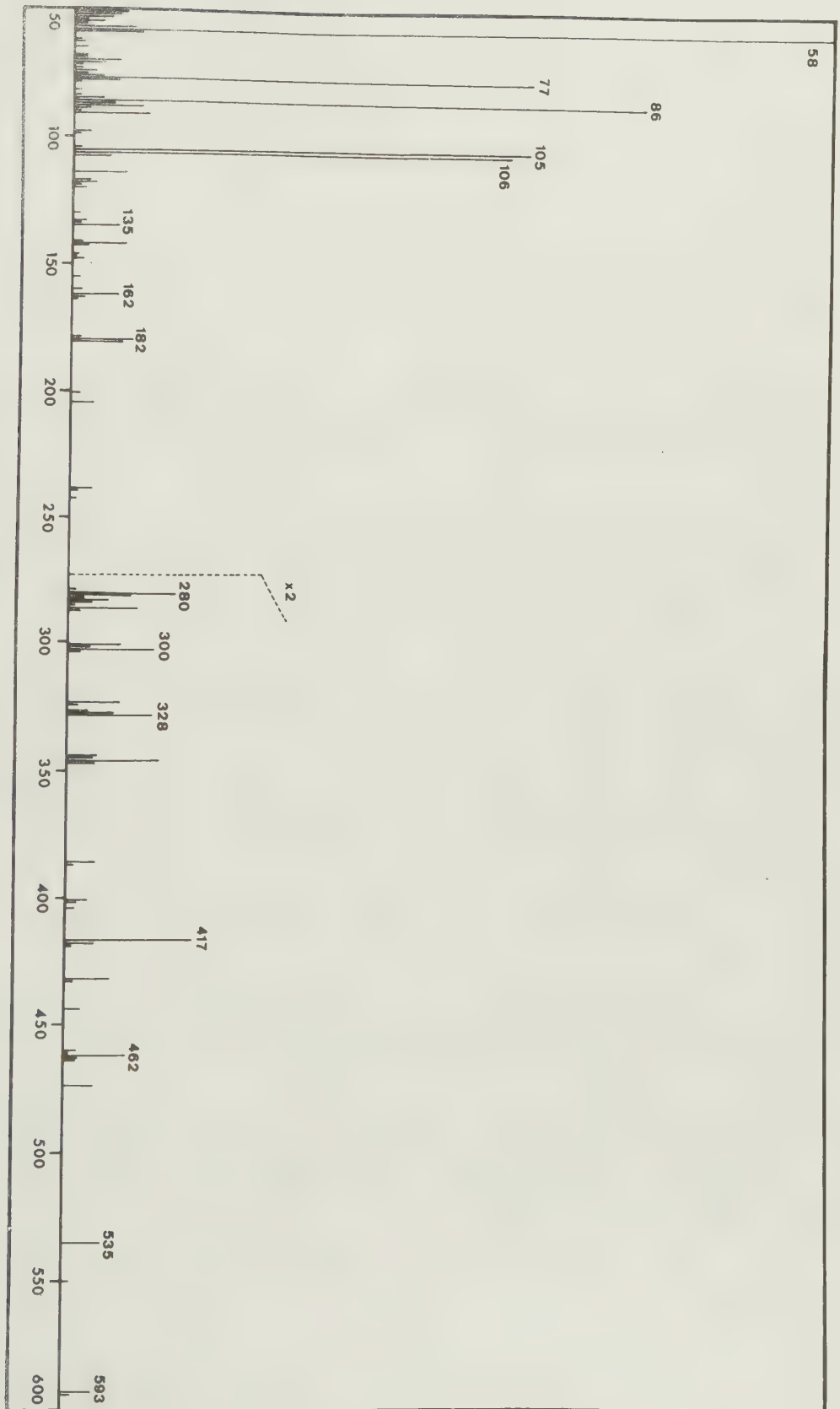


m/e 86

Après la formation de l'ion m/e 593, la principale voie de dégradation de l'alcaloïde semble être l'élimination, sans doute thermique, d'une molécule de N-méthyl-valine. Ce qui conduit à un ion m/e 462, qui se fragmente à son tour de proche en proche, en donnant lui-même l'ion intense m/e 58, et les autres ions de faible intensité observés sur le spectre :

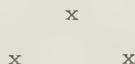


m/e 462



Spectre de masse de la lasiodine A

Ce mode de fragmentation explique pourquoi le spectre de masse de la lasiodine A n'apporte aucun élément permettant de localiser la fonction ester, d'ailleurs le spectre de masse de 27a présente les mêmes ions.



Comme dans le cas de l'hymenocardine (9), le spectre de masse de la lasiodine A n'a pas suffi pour établir la structure de cet alcaloïde, celle-ci a été démontrée grâce à une étude chimique et physique complète.

Cependant, malgré les difficultés d'obtention et la complexité apparente des spectres de masse de l'hymenocardine et de la lasiodine A, l'interprétation de ces spectres montre que les fragmentations s'effectuent selon des lois simples : elles ont toujours lieu en α d'hétéroatomes, avec rétention de la charge sur l'atome d'azote basique, ce qui conduit à un ion très intense, ou sur l'un quelconque des autres hétéroatomes, d'où de nombreux ions dont la plupart de très faible intensité.

En tenant compte de ces remarques, il devrait donc être possible, dans le cas d'alcaloïdes peptidiques ne différant entre eux que par la nature des chaînes carbonées, et non par le nombre et la position respective des hétéroatomes, d'envisager un mode commun de fragmentation.

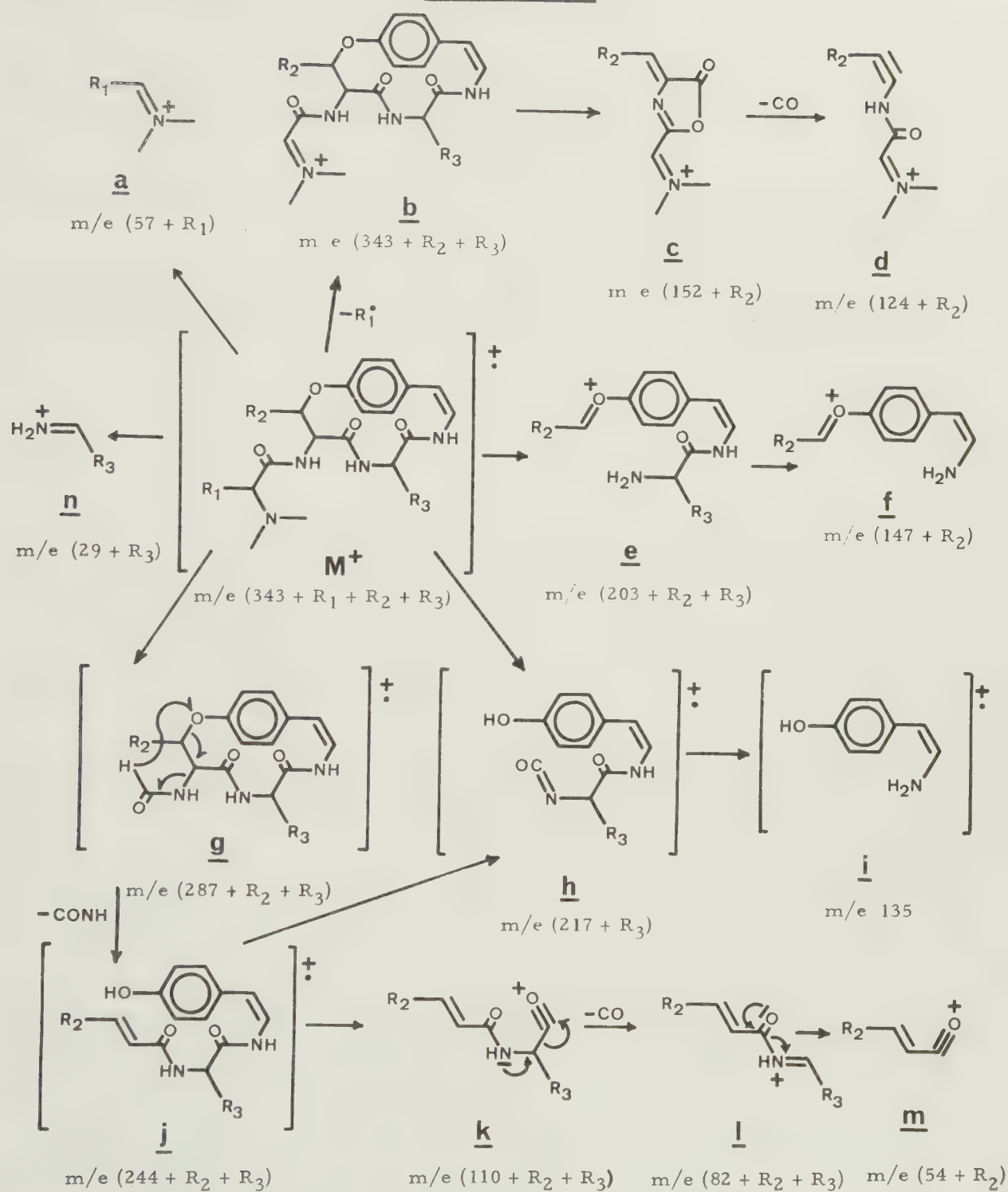
C'est ainsi que TSCHESCHE, en comparant entre eux les spectres de masse de trois alcaloïdes : integerressine et integerrenine (19), frangulanine (20), a pu établir qu'ils possédaient le même type de structure que la pandamine, dont ils ne diffèrent que par la nature des acides aminés qui les constituent.

Le schéma commun de fragmentation proposé par TSCHESCHE pour ces trois alcaloïdes est reproduit dans le tableau IV.

Dans ce schéma, les filiations correspondant aux fragmentations successives ont été proposées dans le but d'en donner une meilleure vue d'ensemble, mais aucune de ces étapes n'a été vérifiée par la présence d'ions métastables. Par contre, tous les ions ont été analysés en haute résolution.

Après formation de l'ion moléculaire M^+ , une fragmentation très favorisée en α de l'atome d'azote basique conduit à l'ion a très intense, pic de base de tous ces spectres, et à l'ion b d'intensité beaucoup plus faible, qui subit une décomposition thermique donnant naissance aux ions c et d. L'apparition de ces ions c et d est fonction des conditions expérimentales.

TABLEAU IV



R_1, R_2, R_3 = restes carbonés des acides aminés.

Les ions e et f résultent d'une ouverture du système cyclique de l'ion M^+ en α de la fonction éther, avec rétention de la charge sur l'oxygène, et d'une décomposition par étapes au niveau des groupes amides.

Une rupture progressive de la chaîne latérale de l'ion M^+ aboutit à la formation de l'ion $\underline{g}$; par perte d'un groupe CONH et ouverture du cycle au niveau de la fonction éther, cet ion $\underline{g}$ donne naissance à l'ion $\underline{j}$ qui, par fragmentations successives, est dégradé en ions $\underline{k}$, $\underline{l}$ et $\underline{m}$.

Les ions h et i peuvent provenir soit de l'ion M^+ par coupure de la chaîne latérale et ouverture du cycle au niveau de la fonction éther, soit de l'ion j par simple coupure de la chaîne latérale.

Disposant de ce schéma de fragmentation, il a été possible de l'appliquer à la détermination de la structure d'alcaloïdes peptidiques nouveaux : les adouétines X et Y, et les myrianthines A, B et C, et de vérifier ainsi, à la fois, son bien-fondé et sa portée générale.

[illegible]

Chapitre V

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES ADOUETINES

X ET Y ET DES MYRIANTHINES A, B ET C

Les adouétines X et Y ont été isolées du Waltheria americana L. (Sterculiacées) (29), et les myrianthines A, B et C ont été extraites du Myrianthus arboreus P. Beauv. (Urticacées) (30).

L'examen comparé des spectres I.R. et U.V. et de la formule brute de ces alcaloïdes a permis d'entrevoir très rapidement que ces molécules pouvaient être classées dans le groupe des alcaloïdes peptidiques.

. Le spectre I.R. de ces alcaloïdes montre les bandes caractéristiques de plusieurs groupes CONH vers $3280-3260\text{cm}^{-1}$, $1640-1630\text{cm}^{-1}$ et 1510cm^{-1} . On peut noter la présence à 1240cm^{-1} d'une bande forte attribuable à une liaison C-O-C d'éther de phénol, ce qui indique que ces alcaloïdes peptidiques sont vraisemblablement cycliques.

. Le spectre U.V. de tous ces alcaloïdes présente, en plus d'une forte absorption aromatique terminale, un épaulement à 250nm pouvant correspondre à la double liaison d'une styrylamine. Ceci est confirmé par le fait que cette absorption à 250nm disparaît après hydrogénation catalytique : le spectre U.V. des dihydro-alcaloïdes ne présente plus que l'absorption aromatique terminale.

En comparant avec le spectre U.V. de la lasiodine A (λ 281nm, $\log \epsilon$ 4,49), on constate que le maximum observé ici à 250nm a une intensité beaucoup plus faible. Il est vraisemblable que ce fait est dû à la structure cyclique de ces alcaloïdes, qui empêche la double liaison de la styrylamine de venir dans le plan du noyau benzénique (19), ce qui n'est pas le cas de la lasiodine A présentant une structure "ouverte".

L'étude des spectres de R.M.N. et de masse de ces alcaloïdes, comparée avec l'examen de leur formule brute, permet de proposer pour chacun d'eux une structure qui est confirmée par l'analyse en CCM des produits d'hydrolyse acide de l'alcaloïde.

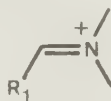
I ADOUETINE X

L'adouétine X, $F = 277-279^\circ$, $[\alpha]_D = -316^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{N}_4$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 500$.

A - ETUDE SPECTRALE -

• Le spectre de R.M.N. (CF_3COOH) présente à 3,21ppm le doublet ($J=5\text{Hz}$) d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ protoné (31). Entre 0,7 et 1,1ppm, on note la présence de 18 protons pouvant correspondre à 6 méthyles aliphatiques, et entre 6,9 et 7,5ppm, on trouve 4 protons aromatiques.

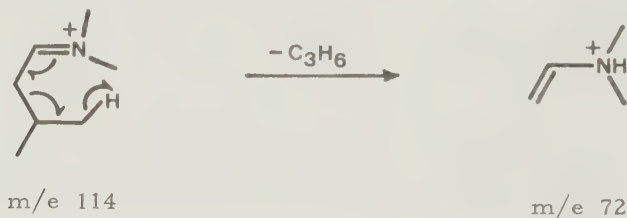
• Le spectre de masse présente un pic très intense à m/e 114 qui correspond à l'ion a du schéma de fragmentation :



a m/e ($57 + \text{R}_1$)

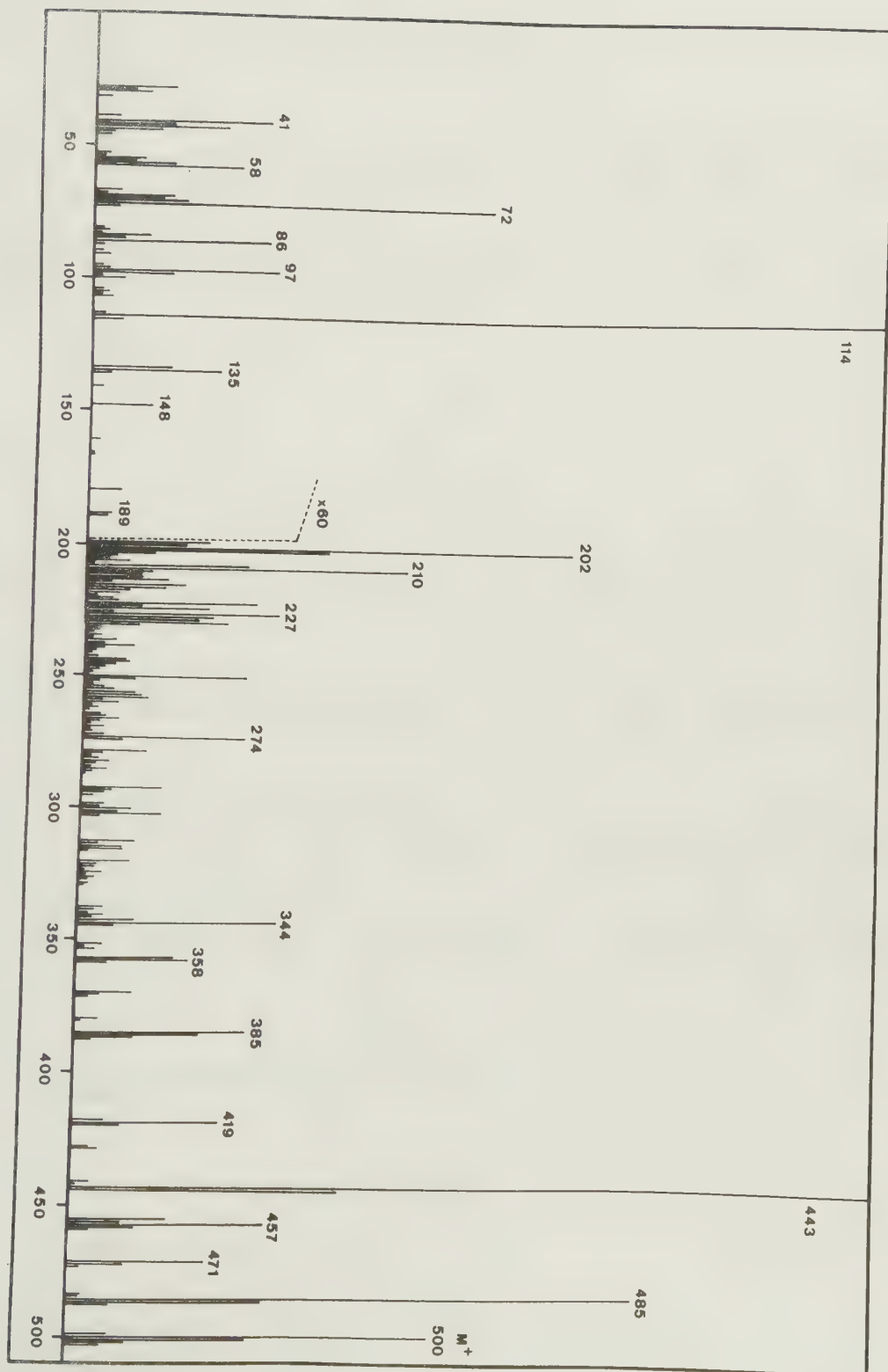
Cet alcaloïde renferme donc un acide aminé N-diméthylé dont le reste carboné $\text{R}_1 = 57$, il peut s'agir d'une N-diméthyl-leucine ou d'une N-diméthyl-isoleucine.

Une étude des ions dérivés de l'ion a (19) permet de préciser la nature de R_1 . Ici, la présence d'un ion à m/e 72, dérivant de l'ion a par perte de propène ($m^* 45,5$ calc. 45,5 pour $114 \rightarrow 72$) indique qu'il s'agit d'une N-diméthyl-leucine :

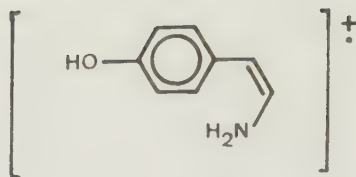


Une étude analogue, effectuée dans le cas de l'hymenocardine, avait permis de confirmer la présence d'une N-diméthyl-isoleucine. La spectrométrie de masse est donc une bonne méthode permettant de distinguer une N-diméthyl-leucine d'une N-diméthyl-isoleucine.

A m/e 135, le spectre présente un ion pouvant correspondre à l'ion i du schéma de fragmentation :



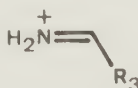
Spectre de masse de l'adouétine X



i m/e 135

Ce résultat, comparé au spectre U.V. de l'adouétine X, indique la présence probable dans l'alcaloïde d'une unité p-hydroxy-styrylamine.

L'examen de la formule brute et du spectre de R.M.N. de l'adouétine X permet de supposer que cet alcaloïde renferme, en outre, un acide α aminé classique, devant donner, par conséquent, un ion "amine" caractéristique, en spectrométrie de masse, analogue à l'ion n du schéma de fragmentation :



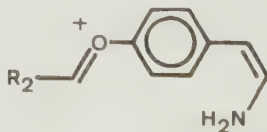
n m/e (29 + R₃)

Le spectre de R.M.N. indiquant que cet acide aminé ne peut avoir un reste carboné aromatique, mais doit renfermer au contraire des méthyles aliphatiques, l'ion à m/e 86 dans le spectre de masse peut correspondre à l'ion n.

Cet acide aminé renferme donc un reste carboné R₃ = 57, il peut s'agir d'une leucine ou d'une isoleucine, mais dans ce cas il est impossible de différencier ces deux acides aminés par le seul examen du spectre de masse.

Le spectre I.R. ayant indiqué la présence possible d'une liaison éther de phénol dans l'adouétine X, on peut penser que l'alcaloïde renferme un quatrième fragment constitué par un acide α -aminé β -hydroxylé dont la fonction alcool est engagée dans une liaison éther avec la p-hydroxy-styrylamine.

Cette hypothèse est en accord avec la formule brute de l'alcaloïde, par conséquent le spectre de masse doit présenter un ion correspondant à l'ion f du schéma de fragmentation :



f m/e (147 + R₂)

Le spectre de R.M.N. montre que cet acide α -aminé β -hydroxylé doit renfermer deux méthyles aliphatiques ; l'ion à m/e 190 peut donc correspondre à l'ion f, ce qui donnerait à ce fragment la structure d'une β -hydroxy-leucine ou d'une β -hydroxy-isoleucine.

La présence d'un pic M-43 important dans le spectre de l'adouétine X permet d'affirmer qu'il s'agit d'une β -hydroxy-leucine, tandis qu'une β -hydroxy-isoleucine donnerait naissance à une fragmentation secondaire M-29 (28b).

L'interprétation du spectre de masse a donc permis d'identifier les quatre fragments constituant l'adouétine X, en tenant compte des renseignements fournis par l'analyse et les spectres I.R., U.V. et de R.M.N. Les autres ions observés sur le spectre correspondent à ceux du schéma de fragmentation et permettent de proposer pour cet alcaloïde une hypothèse de structure.

Afin de confirmer cette hypothèse, l'adouétine X est soumise à une hydrolyse acide dans le mélange $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ habituel.

B - HYDROLYSE ACIDE -

L'analyse en CCM de silice et de cellulose de l'hydrolysate, révèle la présence de N-diméthyl-leucine et d'isoleucine.

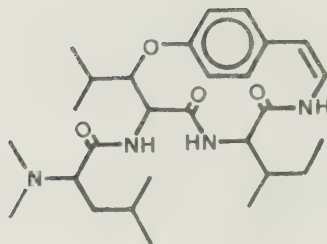
Ainsi, l'hydrolyse acide réalisée sur de faibles quantités d'alcaloïde permet non seulement de confirmer les résultats fournis par la spectrométrie de masse, mais encore de les compléter. En effet, l'examen du spectre de masse n'avait pas permis de choisir entre la leucine et l'isoleucine, tandis que l'analyse en CCM de cellulose (32, 33) de l'hydrolysate, dans un système de solvants approprié, a montré qu'il s'agissait d'isoleucine.

Cependant, dans ces conditions d'hydrolyse, le fragment p -hydroxy-styrylamine donne naissance à des produits de décomposition, ce qui rend impossible sa mise en évidence directe. Pour prouver la présence de ce fragment dans l'adouétine X, celle-ci a été hydrogénée catalytiquement et le dérivé dihydrogéné obtenu hydrolysé par HCl 6N en tube scellé à 120° .

La p -tyramine n'étant présente qu'en très faibles quantités dans l'hydrolysate, elle a été caractérisée sans ambiguïté par une micro-réaction de copulation avec l'acide p -sulfanilique diazoté, qui permet de la distinguer de son isomère méta, ce que ne permet pas l'analyse en CCM.

La mesure de l'absorption en U.V. du dérivé azoïque obtenu indique qu'il s'agit bien de l'isomère para (λ 323nm), l'isomère méta présentant une absorption à λ 362nm dans les mêmes conditions (34). Les acides aminés présents dans l'hydrolysate n'interfèrent pas.

Ces résultats permettent d'attribuer à l'adouétine X la structure 38, proche de celle de la pandamine.

38

II ADOUETINE Y

L'adouétine Y, $F = 292^\circ$, $[\alpha]_D = -230^\circ$ ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/1, $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{N}_4$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 568$.

Le spectre de R. M. N. (CF_3COOH) présente à 2,40 et 2,82ppm deux doublets ($J = 5 \text{ Hz}$) correspondant à 3 protons chacun. Ces deux signaux peuvent être attribués à un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ protoné (31), dont l'un des méthyles se trouve déplacé sous l'influence du champ diamagnétique d'un noyau benzénique proche. Ce fait a déjà été observé dans le cas de l'integerrenine et de l'integerressine (19), renfermant une unité β -hydroxy-phénylalanine.

En tenant compte des renseignements fournis par la formule brute et les spectres U.V., I.R. et de R.M.N., l'examen du spectre de masse permet d'identifier les différents fragments de l'adouétine Y, par un raisonnement analogue à celui tenu pour l'adouétine X.

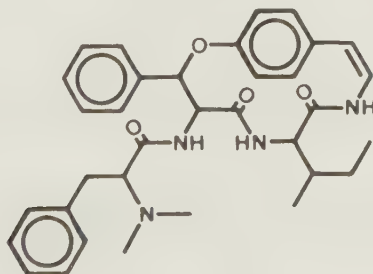
Les résultats sont résumés dans le tableau V.

IONS	<u>a</u> . m/e (57 + R ₁)	<u>n</u> m/e (29 + R ₃)	<u>f</u> m/e (147 + R ₂)	<u>i</u>
m/e observé	148	86	224	135
Poids du reste carboné	R ₁ = 91	R ₃ = 57	R ₂ = 77	
Nature du reste carboné	C ₆ H ₅ CH ₂ -	C ₄ H ₉ -	C ₆ H ₅ -	
Fragment *	Me ₂ Phe	Leu ou Ile	3 Hyphe	p-hydroxy-styrylamine
* - La nomenclature utilisée est conforme aux recommandations de l'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (35).				

TABLEAU V

Les résultats de l'hydrolyse acide de l'adouétine Y confirment l'identité de ces fragments et permettent d'affirmer que l'acide aminé classique est une isoleucine, comme dans le cas de l'adouétine X.

Les autres ions observés sur le spectre de masse de l'alcaloïde confirment la structure 39 attribuée à l'adouétine Y.

39

III MYRIANTHINE A

La myrianthine A, $F = 286^\circ$ (déc.), $[\alpha]_D = -263^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_4$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 534$.

Le spectre de R.M.N. (CDCl_3) présente à 1,76ppm le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Entre 0,6 et 1,0ppm apparaissent les signaux de quatre méthyles aliphatiques et entre 6,9 et 7,6ppm on note la présence de 9 protons aromatiques.

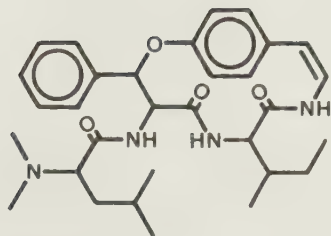
L'examen du spectre de masse de la myrianthine A conduit à l'identification des différents fragments en utilisant les renseignements fournis par l'analyse et les spectres U.V., I.R. et de R.M.N. Les résultats figurent dans le tableau VI.

IONS	<u>a</u> m/e ($57 + \text{R}_1$)	<u>n</u> m/e ($29 + \text{R}_3$)	<u>f</u> m/e ($147 + \text{R}_2$)	<u>i</u>
m/e observé	114	86	224	135
Poids du reste carboné	$\text{R}_1 = 57$	$\text{R}_3 = 57$	$\text{R}_2 = 77$	
Nature du reste carboné	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\text{CH}_2-$	C_4H_9-	C_6H_5-	
Fragment	Me_2Leu	Leu ou Ile	3 Hyphe	p-hydroxy-styrylamine

TABLEAU VI

L'analyse en CCM de l'hydrolysat acide de la myrianthine A et de son dérivé dihydrogéné confirme ces résultats et révèle que l'acide aminé est une isoleucine, comme dans le cas des adouétines X et Y.

Les autres ions observés sur le spectre de masse de l'alcaloïde sont en accord avec la structure 40 attribuée à la myrianthine A.



40

IV MYRIANTHINE B

La myrianthine B, $F = 302^\circ$ (déc.), $[\alpha]_D = -294^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_4$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $\text{M}^+ = 534$.

Le spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) présente à 2,26ppm le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Entre 0,4 et 1,3ppm apparaissent les signaux de 4 méthyles aliphatiques et entre 7,0 et 7,3ppm, on note la présence de 9 protons aromatiques.

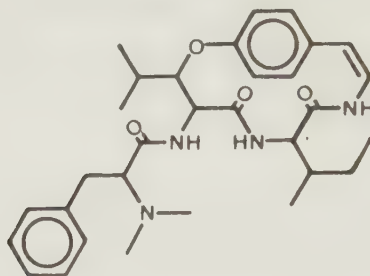
L'examen du spectre de masse de la myrianthine B permet d'identifier ses différents fragments en utilisant les renseignements fournis par l'analyse et les spectres U.V., I.R. et de R.M.N. Les résultats sont résumés dans le tableau VII.

IONS	<u>a</u> m/e ($57 + \text{R}_1$)	<u>n</u> m/e ($29 + \text{R}_3$)	<u>f</u> m/e ($147 + \text{R}_2$)	<u>i</u>
m/e observé	148	86	190	135
Poids du reste carboné	$\text{R}_1 = 91$	$\text{R}_3 = 57$	$\text{R}_2 = 43$	
Nature du reste carboné	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2-$	C_4H_9-	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$	
Fragment	Me_2Phe	Leu ou Ile	3 Hyle	p-hydroxy-styrylamine

TABLEAU VII

L'analyse en CCM de l'hydrolysate acide de la myrianthine B confirme ces résultats et indique que l'acide aminé est une isoleucine comme dans le cas des adouétines X et Y et de la myrianthine A.

Les autres ions observés sur le spectre de masse de l'alcaloïde sont en accord avec la structure 41 attribuée à la myrianthine B.



41

Un alcaloïde extrait du Waltheria americana L. (Sterculiacées), l'adouétine Y', s'est révélé identique à la myrianthine B. La structure de cette adouétine Y', qui n'avait pu être isolée pure, a été établie par l'examen du spectre de masse et l'hydrolyse acide d'un mélange contenant les adouétines Y et Y' en proportions à peu près équivalentes.

V MYRIANTHINE C

La myrianthine C, $F = 294^{\circ}$ (déc.), $[\alpha]_D = -288^{\circ}$ (CHCl_3 , $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_4$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $M^+ = 486$.

Le spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) présente à 2,22ppm le singulet d'un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Entre 0,6 et 1,4ppm apparaissent des signaux attribuables à 6 méthyles aliphatiques et entre 6,9 et 7,1ppm on note la présence de 4 protons aromatiques.

L'examen du spectre de masse de la myrianthine C permet d'identifier les fragments qu'elle renferme, en tenant compte des renseignements fournis par l'analyse et les spectres U.V., I.R. et de R.M.N.

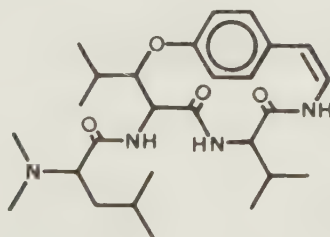
Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VIII.

IONS	<u>a</u> m/e (57 + R ₁)	<u>n</u> m/e (29 + R ₃)	<u>f</u> m/e (147 + R ₂)	<u>i</u>
m/e observé	114	72	190	135
Poids du reste carboné	R ₁ = 57	R ₃ = 43	R ₂ = 43	
Nature du reste carboné	(CH ₃) ₂ CH-CH ₂ -	(CH ₃) ₂ CH-	(CH ₃) ₂ CH-	
Fragment	Me ₂ Leu	Val	3 Hyle	p-hydroxy-styrylamine

TABLEAU VIII

L'analyse en CCM de l'hydrolysate acide de la myrianthine C confirme ces résultats, en particulier que l'acide aminé classique de cet alcaloïde est bien représenté par la valine. En effet, l'ion m/e 72 observé sur le spectre de masse pouvait correspondre aussi bien à l'ion "amine" de la valine, qu'à un ion dérivant de l'ion a par perte de propène (19).

Les autres ions observés sur le spectre de masse de la myrianthine C sont en accord avec la structure 42 attribuée à cet alcaloïde.

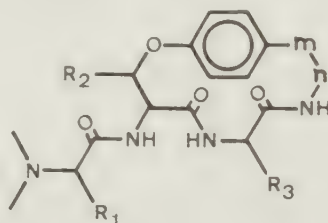
42

Ainsi, la spectrométrie de masse, associée à l'hydrolyse acide et à l'examen de la formule brute et des spectres U.V., I.R. et de R.M.N., a permis d'établir la structure de cinq alcaloïdes peptidiques cycliques nouveaux.

Ces résultats montrent que le schéma de fragmentation proposé par TSCHESCHE (10) est un schéma général et peut s'appliquer par conséquent à la détermination de structure d'autres alcaloïdes peptidiques cycliques.

L'examen comparé des structures de la pandamine, des adouétines X et Y et des myrianthines A, B et C étudiées au cours de ce travail, et de celles de l'integerressine, de l'integerrenine et de la frangulanine établies par TSCHESCHE, montre que tous ces alcaloïdes peptidiques nouveaux sont du même type que la pandamine.

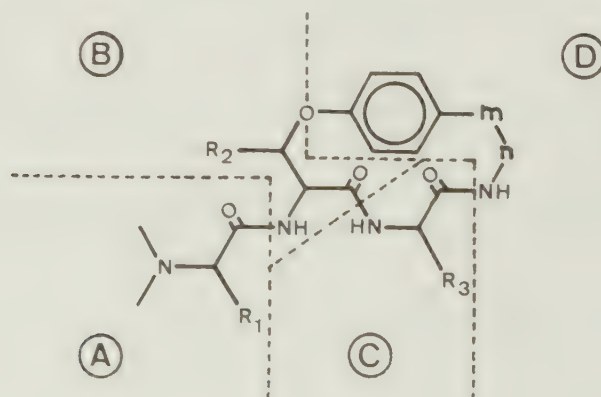
Tous ces alcaloïdes peptidiques présentent, en effet, le même type d'enchaînement et possèdent un cycle à 14 chaînons ; ils ne diffèrent entre eux que par la nature des acides aminés les constituant et répondent à la formule générale, 43.



43

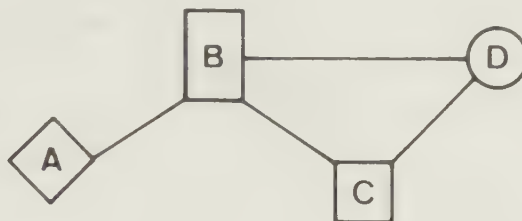
Dans cette formule générale 43, R_1 , R_2 et R_3 représentent les restes carbonés (aliphatiques ou aromatiques) des acides aminés, tandis que -m-n- est représenté par -CHOH-CH₂- dans la pandamine et par -CH=CH- dans tous les autres alcaloïdes.

On constate ainsi que tous ces alcaloïdes sont formés par l'enchaînement de quatre fragments, que nous proposons d'appeler A, B, C et D et que l'on peut représenter de la façon suivante :



Dans ces alcaloïdes, le fragment A est toujours un acide aminé N-diméthylé, le fragment B un acide α aminé β hydroxylé, le fragment C un acide aminé normal et le fragment D un aminophénol : presque toujours la p-hydroxy-styrylamine.

Le mode d'enchaînement de ces différents fragments peut être représenté par le schéma suivant :



Ce schéma met en évidence le fait que le fragment B est relié aux 3 autres fragments ; les liaisons A-B, B-C et C-D sont peptidiques, tandis que la liaison B-D est un pont éther.

On peut appeler ce schéma "cyclique de type 4", car il comporte les éléments B, C et D d'un cycle auquel est lié un quatrième élément A.

Les connaissances acquises au cours de la détermination de la structure de ces alcaloïdes peptidiques ont permis de mettre au point une méthode d'étude pour établir rapidement, et sur de très petites quantités de produit, la structure de tout alcaloïde nouveau entrant dans le groupe des alcaloïdes peptidiques cycliques de type 4.

Cette méthode d'analyse, simple et élégante, permettant même de déterminer la structure d'un alcaloïde en mélange avec un autre, repose sur l'interprétation systématique du spectrogramme de masse de l'alcaloïde à partir du schéma proposé par TSCHESCHE, l'analyse en CCM des produits d'hydrolyse acide de l'alcaloïde vient ensuite confirmer et compléter les renseignements fournis par le spectre de masse.

Pour interpréter le spectrogramme de masse de ces alcaloïdes, nous avons proposé de classer les différents ions du schéma de fragmentation en deux groupes :

1) - Les ions caractéristiques des fragments A, B, C et D précédemment définis : ions a et b, ions m, n et i.

Ces ions permettent d'identifier les restes R_1 , R_2 et R_3 et de connaître la nature du fragment aminophénol.

2) - Les ions formés de deux ou trois fragments.

Ces ions permettent de déterminer la position au sein de la molécule des différents fragments A, B, C et D et d'établir par conséquent le mode d'enchaînement de ces alcaloïdes.

Ce sont : - les ions communs à A et B : ions c et d du schéma ;
- les ions communs à B et C : ions l et k du schéma ;

- un ion commun à B et D : ion f du schéma ;
- un ion commun à C et D : ion h du schéma ;
- les ions communs à B, C et D : ions e, j et g du schéma.

En essayant d'appliquer cette méthode d'étude (spectrométrie de masse + hydrolyse acide) à la détermination de la structure de deux alcaloïdes peptidiques nouveaux : adouétine Z et lasiodine B, il est apparu que les spectres de masse de ces alcaloïdes présentaient quelques différences avec ceux des alcaloïdes cycliques de type 4.

L'étude de la structure de ces deux alcaloïdes a donc été entreprise séparément.

==:==:==:==:==:==:==:==:==:==

Chapitre VI

DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE L'ADOUETINE Z ET DE LA LASIODINE B

L'adouétine Z a été isolée du Waltheria americana L. (Sterculiacées) (29) et la lasiodine B du Lasiodiscus marmoratus C.H. Wright (Rhamnacées) (21).

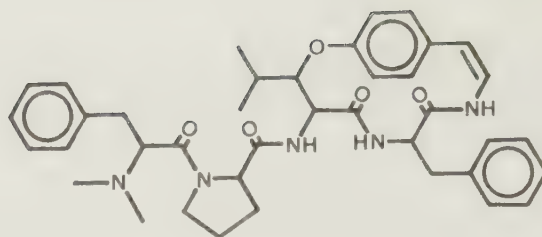
L'examen comparé des spectres U.V. et I.R. et de la formule brute de ces alcaloïdes a permis de montrer très rapidement que l'adouétine Z et la lasiodine B pouvaient être classées dans le groupe des alcaloïdes peptidiques.

. Le spectre U.V. de ces deux alcaloïdes présente une forte absorption terminale de type aromatique, à laquelle se surajoute une absorption vers 250nm qui disparaît dans les dérivés dihydrogénés. Il est donc identique à celui des alcaloïdes peptidiques cycliques étudiés précédemment, ce qui indique la présence probable d'un fragment p-hydroxy-styrylamine vraisemblablement inclus dans un cycle à 14 chaînons.

. Le spectre I.R. montre les bandes caractéristiques d'un ou plusieurs groupes CONH à $3280-3260\text{cm}^{-1}$, 1630cm^{-1} et $1510-1505\text{cm}^{-1}$. A 1240cm^{-1} apparaît une bande forte attribuable à une liaison C-O-C de type éther de phénol, ces deux alcaloïdes renferment donc probablement un cycle formé par liaison éther.

L'examen de leur formule brute indique que ces deux alcaloïdes sont d'un type différent de celui des alcaloïdes cycliques de type 4 et permet de penser qu'ils ont plutôt une structure du même type que celle de l'hymenocardine étudiée au début de ce travail, et de la scutianine, 44, publiée simultanément par TSCHESCHE (18).

Dans la structure de la scutianine, le fait remarquable est la présence d'un acide aminé supplémentaire : la proline, intercalée entre le fragment A et le fragment B.



44

Le spectre de masse de cet alcaloïde est particulier, mais il n'est cependant pas très différent du schéma général et les fragmentations se font selon les lois usuelles observées pour tous les alcaloïdes cycliques de type 4.

En effet, ce spectre présente les ions caractéristiques des fragments A, B, C et D, accompagnés d'un ion "amine" révélateur de la présence de la proline. Il présente, en outre, les ions f et h du schéma général et deux autres ions permettant de relier la proline aux fragments A et B. Après avoir établi la structure de la scutianine, TSCHESCHE n'a pu proposer un schéma général de fragmentation pour ce type d'alcaloïde puisqu'il n'en avait qu'un seul à sa disposition.

En ce qui concerne l'hymenocardine, elle possède un acide aminé supplémentaire représenté par la valine. Son spectre de masse est tout à fait particulier et diffère à la fois de celui de la scutianine et de ceux des alcaloïdes cycliques de type 4.

L'examen des spectres de masse de l'adouétine Z et de la lasiodine B doit permettre de montrer à quel groupe ces deux alcaloïdes se rattachent : celui de la scutianine ou celui de l'hymenocardine.

L'hypothèse de structure, déduite de l'étude systématique du spectre de masse, pourra être confirmée ensuite par une analyse en CCM des produits d'hydrolyse acide de chaque alcaloïde.

I ADOUETINE Z

L'adouétine Z, $F = 140-145^\circ$, $[\alpha]_D = -184^\circ$ (CHCl_3 , $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{N}_5$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $M^+ = 699$.

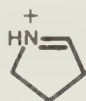
Le spectre de R.M.N. (CCl_4) présente à 1,93 et 2,34ppm deux singulets correspondant à 3 protons chacun. Lorsque le spectre est effectué dans l'acide trifluoroacétique, ces deux signaux sont déplacés et dédoublés, on observe deux doublets ($J=5\text{Hz}$) à 2,95 et 3,27ppm. Ces deux signaux peuvent donc être attribués à un groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, protoné dans l'acide trifluoroacétique (31) et dont l'un des méthyles se trouve déplacé sous l'influence du champ diamagnétique d'un noyau benzénique proche (19), comme dans le cas de l'adouétine Y.

Entre 6,2 et 7,5ppm, apparaissent des signaux correspondant à plusieurs protons aromatiques.

Le spectre de masse de l'adouétine Z est très semblable à celui de la scutianine. En effet, il présente un ion très intense à m/e 148 qui correspond à l'ion a et indique que le fragment A de cet alcaloïde est la N-diméthyl-phénylalanine.

A m/e 131, 120 et 135, sont situés les ions m, n et i caractéristiques des fragments B, C et D. Le fragment B est donc la β -hydroxy-phénylalanine (ou β -phénylsérine), le fragment C la phénylalanine et le fragment D la p-hydroxy-styrylamine.

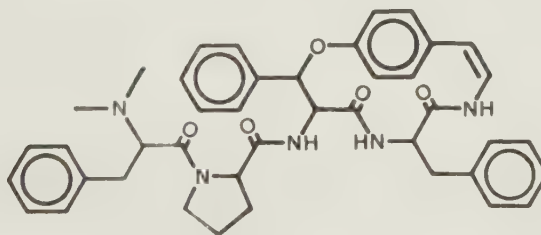
A m/e 70, est situé un ion que l'on peut considérer comme l'ion "amine" de l'acide aminé supplémentaire, cet ion est caractéristique de la proline.



m/e 70

Ainsi, l'adouétine Z renferme le même acide aminé supplémentaire que la scutianine, nous appellerons cet acide aminé le fragment E.

Connaissant la nature des cinq fragments A, B, C, D et E qui constituent l'adouétine Z, on peut proposer pour cet alcaloïde la structure 45 qui présente le même type d'enchaînement que la scutianine.

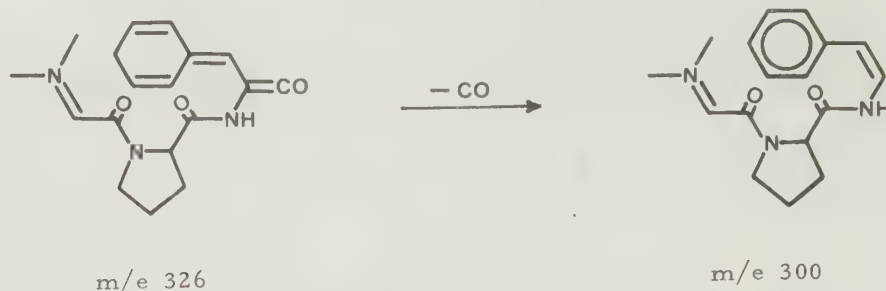


45

La présence d'ions correspondant à plusieurs fragments dans le spectre de masse de l'adouétine Z confirme cette structure 45. On observe, en effet, dans ce spectre :

- un ion f à m/e 224 correspondant aux fragments B + D ;
- un ion h à m/e 308 correspondant aux fragments C + D ;
- un ion j à m/e 412 correspondant aux fragments B + C + D ;
- un ion g à m/e 455 correspondant au cycle entier non fragmenté, avec l'amorce du fragment A.

En outre, deux ions particuliers ne correspondant pas au schéma général de fragmentation, permettent d'affirmer que le fragment E est bien relié au fragment A et au fragment B. Ces deux ions sont situés à m/e 326 et m/e 300 ; ils ne comportent qu'une partie du fragment A et dérivent l'un de l'autre par perte de CO :



L'analyse en CCM de cellulose des produits d'hydrolyse acide de la dihydro-adouétine Z confirme la structure 45 proposée pour l'adouétine Z. Elle permet, en effet, d'identifier dans l'hydrolysate les taches de la proline, la phénylalanine, la N-diméthyl-phénylalanine et la p-tyramine, caractérisée d'autre part par micro-copulation avec l'acide p-sulfanilique diazoté (34).

II LASIODINE B

La lasiodine B, $F = 221^\circ$, $[\alpha]_D = -301^\circ$ ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/1, $c = 1$), répond à la formule brute $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_5$, confirmée en spectrométrie de masse par un ion $M^+ = 617$.

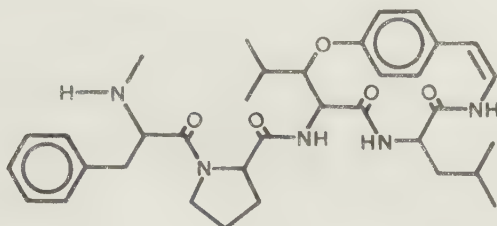
Le spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) présente à 2,29ppm le singulet d'un groupe NCH_3 . Entre 0,6 et 1,4ppm, apparaissent des signaux mal différenciés attribuables à 4 méthyles aliphatiques. On observe également, entre 6,5 et 7,6ppm, les signaux de 13 protons pouvant correspondre à des cycles benzéniques et à des groupes CONH .

Le spectre de masse de la lasiodine B ressemble également à celui de la scutianine. Il présente un ion a très intense à m/e 134, le fragment A de cet alcaloïde est donc la N-méthyl-phénylalanine, compte tenu des renseignements fournis par le spectre de R.M.N. La lasiodine B est le premier alcaloïde peptidique dont le fragment A présente une fonction amine secondaire NHCH_3 .

Les ions m et i à m/e 97 et m/e 135 indiquent que le fragment B est la β -hydroxy-leucine (fragmentation secondaire M-43) et le fragment D la p-hydroxy-styrylamine. L'ion n à m/e 86 peut correspondre, comme fragment C, à la leucine ou à l'isoleucine. A m/e 70, l'ion observé doit être l'ion "amine" du fragment E, la lasiodine B renfermerait donc de la proline, comme l'adouétine Z et la scutianine.

L'analyse en CCM de cellulose des produits d'hydrolyse acide de la lasiodine B confirme la présence de N-méthyl-phénylalanine et de proline et permet de montrer que le fragment C de cet alcaloïde est représenté par la leucine.

On peut donc proposer pour la lasiodine B la structure 46, possédant le même type d'enchaînement que l'adouétine Z et la scutianine.



46

Cette structure 46 est confirmée par la présence d'ions correspondant à plusieurs fragments dans le spectre de masse de la lasiodine B. On observe, en effet, dans ce spectre :

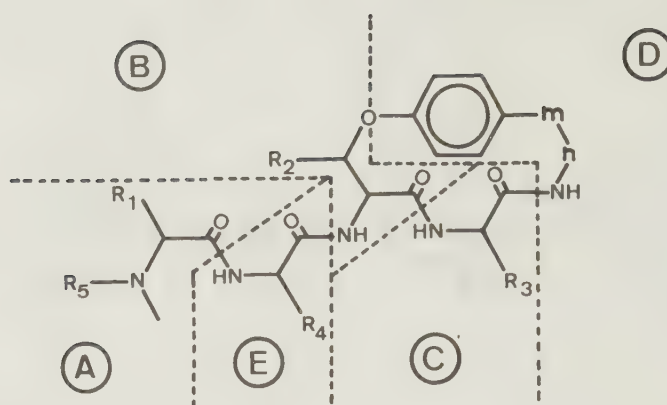
- un ion $f-1$ à m/e 189 correspondant aux fragments B + D ;
- un ion h à m/e 274 correspondant aux fragments C + D ;
- les ions j et g , respectivement à m/e 344 et 387, correspondant aux fragments B + C + D.

Les deux ions à m/e 278 et 252 permettent d'affirmer que le fragment E est bien relié aux fragments A et B, ces ions sont analogues aux ions m/e 326 et 300 observés dans le spectre de l'adouétine Z.



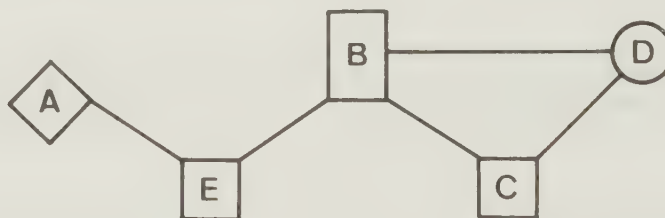
Ainsi, à côté du groupe des alcaloïdes peptidiques cycliques de type 4, apparaît un nouveau type d'alcaloïde peptidique cyclique, dont les premiers représentants sont l'hymenocardine, la scutianine, l'adouétine Z et la lasiodine B.

Les alcaloïdes de ce type renferment un cycle à 14 chaînons et comportent outre les 4 fragments A, B, C et D, un acide aminé E supplémentaire dans la chaîne latérale, placé entre les fragments A et B. Ces alcaloïdes ne diffèrent entre eux que par la nature de leurs acides aminés et répondent à la formule générale suivante :



Dans cette formule générale, R_1 , R_2 , R_3 et R_4 représentent les restes carbonés des fragments A, B, C et E, tandis que R_5 représente un méthyle ou plus rarement un hydrogène ; -m-n- est représenté par $-\text{CO}-\text{CH}_2-$ dans l'hymenocardine et $-\text{CH}=\text{CH}-$ dans tous les autres alcaloïdes de ce type.

Le mode d'enchaînement des différents fragments de ces alcaloïdes peut être représenté par le schéma suivant :



Ce schéma met en évidence les liaisons du fragment B avec les trois éléments C, D et E. Les liaisons A-E, E-B, B-C, C-D sont peptidiques et la liaison B-D est un pont éther. Ce schéma structural est appelé "cyclique de type 5", car au cycle à trois éléments B, C, D, sont reliés deux fragments : A et E.

L'étude comparée des spectres de masse de la scutianine, de l'adouétine Z et de la lasiodine B met en évidence l'influence du fragment supplémentaire E sur le mode de fragmentation de ces alcaloïdes, et montre qu'un schéma de fragmentation commun peut s'appliquer à ces trois alcaloïdes dont le fragment E est représenté par la proline.

Les ions caractéristiques des fragments A, B, C et D sont les mêmes que ceux du schéma général, auxquels s'ajoute l'ion "amine" caractéristique du fragment E. Par contre, en ce qui concerne les ions formés de plusieurs fragments, certains ions du schéma général sont absents, tandis que d'autres nouveaux apparaissent, révélant la présence du fragment E. Les deux ions l et k correspondant aux fragments B + C et

l'ion e correspondant aux fragments B + C + D, ne sont pas observés sur les spectres de ces alcaloïdes. Les ions c et d, correspondant aux fragments A + B, sont remplacés par des ions que l'on peut nommer c' et d', qui mettent en évidence l'enchaînement des fragments A, E et B, en ne comportant toutefois qu'une partie du fragment A.

Ces ions c' et d' prouvent ainsi la position du fragment E dans la chaîne latérale de l'alcaloïde.

L'interprétation systématique du spectre de masse, basée sur ces règles de fragmentation et confirmée par une analyse en CCM des produits d'hydrolyse acide de l'alcaloïde, semble donc être une bonne méthode d'étude pour établir la structure d'un nouvel alcaloïde peptidique cyclique de type 5, sous réserve que la proline ne joue pas un rôle particulier dans la fragmentation des alcaloïdes étudiés.

L'hymenocardine, seul alcaloïde connu de ce groupe ne renfermant pas la proline comme fragment E, présente un spectre de masse tout à fait différent de celui des autres alcaloïdes de type 5.

Cela tient à deux particularités structurales qui modifient le mode de fragmentation de cet alcaloïde en spectrométrie de masse :

- le carbone quaternaire de la β -hydroxy-valine qui représente le fragment B ;
- le système azoté particulier du fragment C, représenté par le tryptophane.

Dans le spectre de l'hymenocardine, on n'observe pas d'ion caractéristique du fragment B, par contre le fragment C (tryptophane) donne naissance à deux ions très intenses, en plus de l'ion n. Un seul des ions communs à plusieurs fragments est présent : l'ion g ; la formation des autres ions résulte de la présence simultanée du tryptophane et du carbone quaternaire de la β -hydroxy-valine, ce dernier étant responsable de la rupture facile de la liaison éther par β -élimination d'origine thermique.

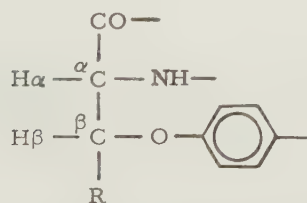
==:==:==:==:==:==:==:==:==:==

Chapitre VII

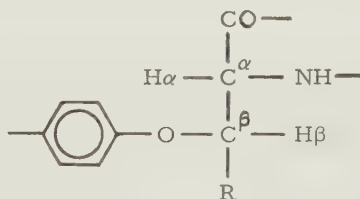
DETERMINATION DE LA CONFIGURATION D'UN FRAGMENT B

La détermination de cette configuration est intéressante et de portée générale puisque la lasiodine A exceptée, tous les alcaloïdes peptidiques possèdent un fragment B, défini précédemment comme un acide α aminé β -hydroxylé dont la fonction alcool est engagée dans une liaison éther de phénol avec l'hydroxyle d'un aminophénol.

Ce fragment présentant deux carbones asymétriques $C\alpha$ et $C\beta$ peut exister sous deux configurations : thréo ou erythro, qui peuvent être représentées de la manière suivante, en projection de FISCHER :



Erythro



Thréo

R = reste carboné (aliphatique ou aromatique) du fragment B.

L'étude de la configuration de ce fragment n'avait pas été abordée de façon rigoureuse; il est en effet impossible de tirer des conclusions de la mesure de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ des protons $\text{H}\alpha$ et $\text{H}\beta$, car les carbones α et β qui portent ces hydrogènes font partie d'un cycle complexe à 14 chaînons dont on ne peut préjuger de l'état conformationnel.

On ne peut donc aborder la détermination de la configuration du fragment B qu'après coupure de la molécule et obtention d'un fragment correspondant à B.

D'autre part, l'isolement d'un fragment acide α -aminé β -hydroxylé et la détermination de sa configuration absolue sont insuffisants pour prouver la configuration de ce même fragment dans l'alcaloïde. En effet, dans une telle molécule, rien ne permet d'affirmer qu'il y ait eu rétention de configuration au cours de l'hydrolyse.

Ceci implique que la méthode utilisée pour obtenir un fragment correspondant à B soit respectée à coup sûr la configuration initiale de l'alcaloïde, soit lui fasse subir une transformation connue.

I OBTENTION D'UN FRAGMENT CORRESPONDANT À B

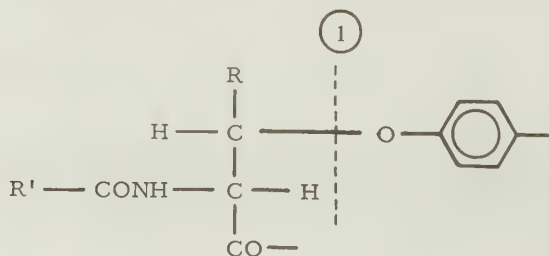
A - TRAVAUX ANTERIEURS -

Les méthodes permettant un clivage des alcaloïdes peptidiques font toutes appel à l'hydrolyse en milieu acide ou alcalin. L'hydrolyse en milieu alcalin est exclue puisqu'elle racémise les carbones α des acides aminés. L'hydrolyse acide provoque en général l'élimination de l'éther de phénol et conduit à un énamide, ce qui fait disparaître les deux carbones asymétriques :



Cependant, TSCHESCHE a pu analyser en CCM de très petites quantités de β -hydroxy-leucine, après hydrolyse par HCl 6N de la scutianine (18), la frangulanine (20), la franganine et la frangufoline (36). De même, BOULVIN a pu isoler une petite quantité de β -phénylsérine, après hydrolyse de la canthiumine (37).

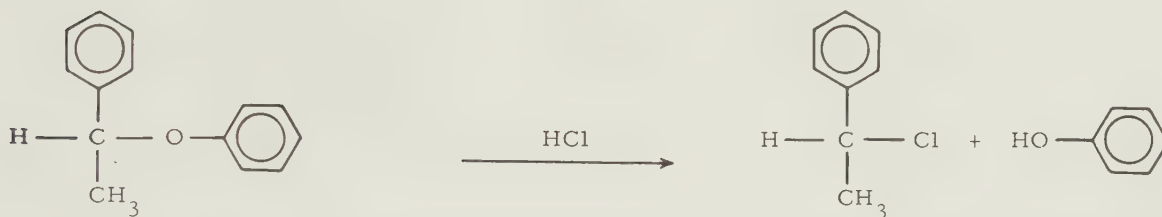
Dans les deux cas, le fragment isolé ou analysé avait une configuration thréo. Mais la méthode utilisée ne répond pas aux critères fixés précédemment ; en effet, l'acide α -aminé β -hydroxylé thréo obtenu résulte d'un clivage selon (1) (38) :



En conséquence, il est impossible d'affirmer que la configuration du fragment isolé ou analysé est la même que celle de l'alcaloïde.

B - AUTRES METHODES -

Parmi les méthodes de clivage des alkylaryl-éthers, il n'existe qu'un seul exemple de coupure ayant respecté la configuration du carbone porteur de la fonction éther (39) :



Dans ce cas, il a été démontré que la réaction a lieu avec 90% de rétention, mais aucune généralisation n'a été tentée.

De toute façon, cette réaction est effectuée dans des solvants tels que toluène, 3-pentanone ou isobutanol, dans lesquels les alcaloïdes peptidiques ne sont pas solubles. Dans des solvants plus polaires, où ces alcaloïdes sont solubles, il a été montré que même dans ce cas, il y a solvolysé, et que la coupure n'est plus stéréospécifique.

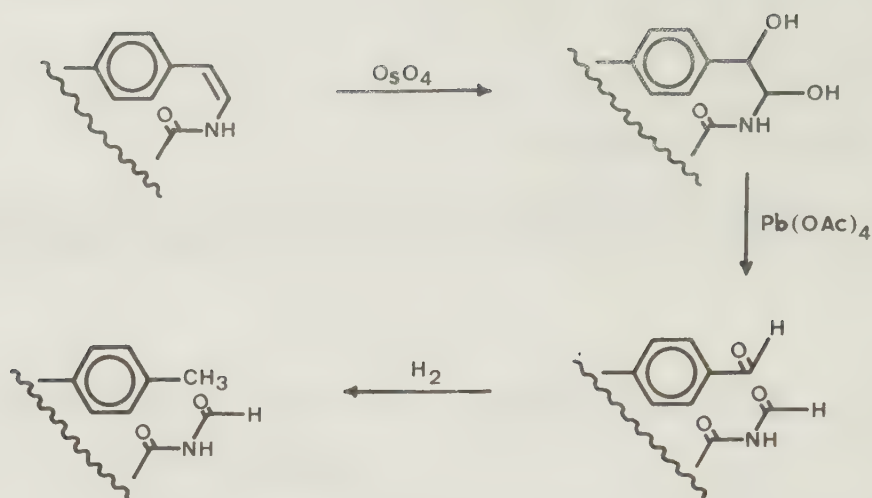
Devant l'absence de méthode éprouvée précédemment décrite, nous avons été conduits à réenvisager le problème et à mettre au point une méthode d'isolement.

C - METHODE D'ISOLEMENT -

L'isolement d'un fragment correspondant à B ayant conservé sa configuration initiale nécessite le clivage de deux liaisons peptidiques, la méthode de dégradation ne peut donc être qu'une hydrolyse acide, conditions qui provoquent, comme il a été dit précédemment, l'élimination de la fonction éther de phénol.

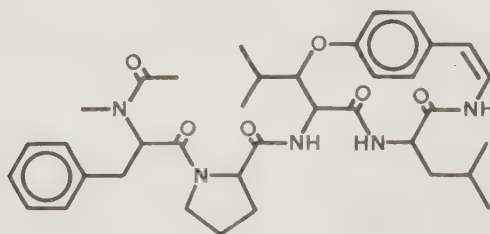
Cette élimination est une réaction inhabituelle ; elle est peut-être due à la présence de cette fonction dans le cycle. L'ouverture de ce cycle a un niveau quelconque, avant d'effectuer l'hydrolyse, pourrait donc restituer à la fonction éther de phénol sa stabilité normale.

Ce clivage pourrait être réalisé par attaque de la double liaison du fragment D, selon le schéma suivant :



La molécule clivée correspondant à un alcaloïde peptidique linéaire, soumise à l'hydrolyse chlorhydrique, devrait permettre, si l'hypothèse initiale est exacte, d'isoler avec rétention de configuration une β -(p-tolyloxy)-leucine, dont il serait possible alors de déterminer la configuration absolue.

La lasiodine B se prête particulièrement à cette dégradation, car elle comporte une fonction amine secondaire pouvant conduire à un dérivé N-acétylé neutre, 47, qui permet d'effectuer l'hydroxylation par le tétraoxyde d'osmium avec un bon rendement.



47

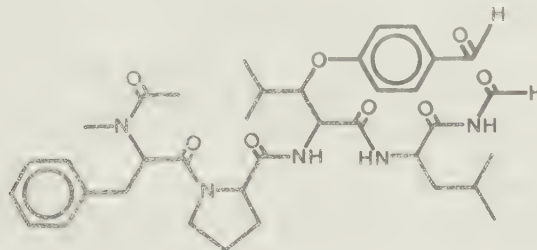
La N-acétyl-lasiodine B, 47, traitée selon la technique décrite par HIRSCHMANN (40), conduit à un mélange de deux produits : l'un est le dérivé dihydroxylé attendu, l'autre résulte d'une coupure oxydante de ce dérivé telle que la réalise le tétracétate de plomb.

Ce mélange a donc été traité directement par le tétracétate de plomb selon le mode opératoire décrit par CRIEGEE (41).

Le spectre I.R. (nujol) du dérivé obtenu présente à 1695cm^{-1} la bande d'un carbonyle d'aldéhyde aromatique, et à 1750cm^{-1} une bande attribuable à un groupe carbonyle d'une fonction imide $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-$.

Le spectre de R.M.N. (CDCl_3) présente à 9,80ppm le singulet d'un proton aldéhydique aromatique et à 8,97 et 9,57ppm deux doublets ($J=9\text{Hz}$) attribuables respectivement aux protons d'un groupe CHO et d'un NH imidiques.

Les autres renseignements fournis par ces spectres sont en accord avec la structure 48 attribuée à ce dérivé.

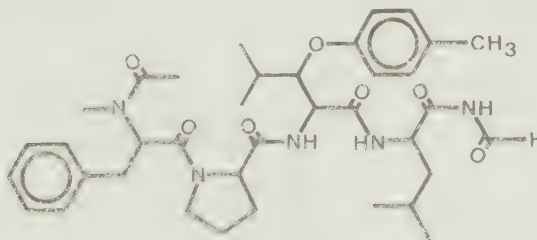


48

Ce produit 48, hydrogéné catalytiquement (C/Pd), conduit à un dérivé 49 dont la structure a été déduite de l'examen de ses spectres I.R. et de R.M.N.

Le spectre I.R. (CHCl_3) présente deux bandes d'absorption à 1750 et 1700cm^{-1} attribuables aux deux groupes carbonyles de la fonction imide.

Sur le spectre de R.M.N. (CDCl_3), le signal à 9,80ppm est remplacé par le singulet à 2,27ppm d'un méthyle aromatique.



49

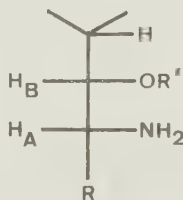
L'hydrolyse du dérivé tétrapeptidique linéaire, 49, a été réalisée dans le mélange HCl/CH₃COOH/H₂O habituel pendant 32 heures. L'analyse de l'hydrolysate en CCM a montré, après révélation par la ninhydrine, quatre taches nettes d'égale importance indiquant que le produit a été hydrolysé de façon quantitative et sans destruction notable. Le R_f en CCM de trois taches de cet hydrolysate permet d'identifier la proline, la leucine et la N-méthyl-phénylalanine.

L'hydrolysate est chromatographié sur résine échangeuse d'ions en phase H⁺ (42, 43), les trois acides aminés élués successivement de la colonne par des solutions d'acide chlorhydrique de plus en plus concentrées sont de configuration L (23).

Le dernier produit est obtenu pur par élution de la colonne avec HCl 6n.

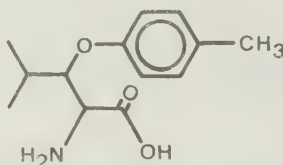
Le spectre de R.M.N. (D₂O) de ce produit isolé sous forme de chlorhydrate présente à 1,06ppm un doublet (J=6,5Hz) attribuable aux deux méthyles d'un groupe isopropyle et à 2,30ppm le singulet d'un méthyle aromatique.

A 4,38 et 4,63ppm apparaissent respectivement un doublet (J=3Hz) et un doublet dédoublé (J=3Hz, J'=8,5Hz) que l'on peut interpréter comme étant ceux des protons H_A et H_B d'un enchaînement :

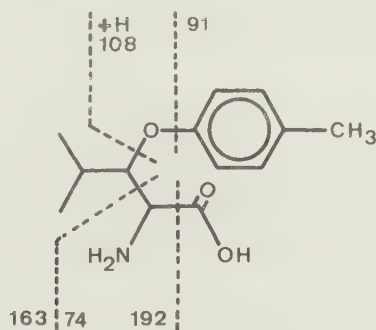


Entre 6,97 et 7,37ppm, on note la présence d'un système A₂B₂ (J_{AB}=9Hz) caractéristique d'un noyau benzénique para-disubstitué.

Ces renseignements permettent de proposer pour le fragment isolé la structure d'une β-(p-tolyloxy)-leucine, 50.



Les ions les plus intenses observés sur le spectre de masse confirment cette structure ; ils correspondent aux fragmentations suivantes :



L'hydrolyse acide du tétrapeptide linéaire, 49, a donc bien permis d'isoler une β -(p-tolyloxy)-leucine, 50, c'est à dire un fragment correspondant à B, qui a effectivement conservé la configuration initiale.

II ETUDE PAR R.M.N. DE LA CONFIGURATION DU FRAGMENT ISOLE

La configuration d'un tel fragment peut évidemment être étudiée par corrélation chimique :

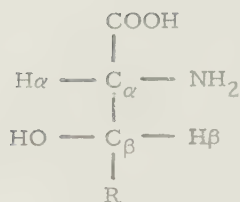
- soit par synthèse stéréospécifique ;
- soit par dégradation et identification à un produit connu.

Ces deux méthodes d'étude sont les plus rigoureuses, mais la première pose un problème complexe, car il n'existe aucune méthode dont la stéréospécificité soit démontrée, qui permette d'introduire une fonction éther de phénol sur le carbone β d'un acide α -aminé ; quant à la seconde, elle présente des difficultés déjà rencontrées lors de l'isolement du fragment.

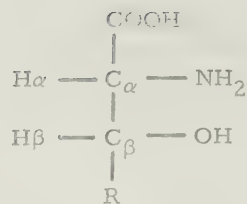
Il nous a donc semblé préférable de tenter, dans un premier temps, la détermination de la configuration par une méthode physique : la R. M. N.

A - SPECTRES DE R.M.N. DES ACIDES α -AMINES β -HYDROXYLES -

Les acides α -aminés β -hydroxylés comportent deux carbones asymétriques α et β et peuvent donc exister sous deux configurations : thréo et erythro, représentées de la manière suivante en projection de FISCHER :



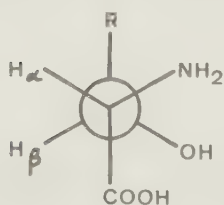
Thréo



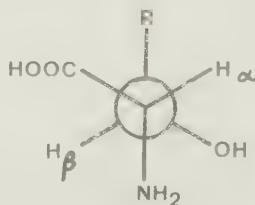
Erythro

R = reste carboné de l'acide aminé

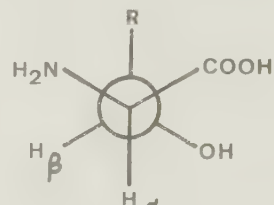
En raison de la libre rotation de la liaison $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$, chaque isomère possède trois conformations possibles qui peuvent être représentées en projection de NEWMAN par a, b, c :



a

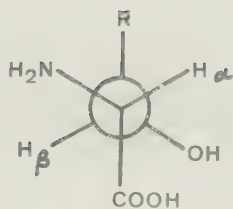


b

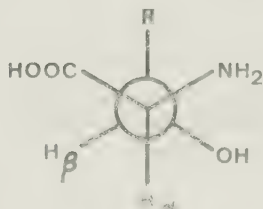


c

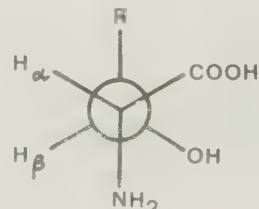
THREO



a



b



c

ERYTHRO

La stabilité respective de tels conformères dépend habituellement de la taille et de la nature des groupements portés par les carbones α et β .

Dans le cas des acides α -aminés β -hydroxylés, si l'on considère les seuls facteurs stériques, on peut penser à priori que les deux conformères a doivent être favorisés et qu'il devrait être possible de distinguer un isomère thréo d'un isomère erythro par la mesure de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ des protons $\text{H}\alpha$ et $\text{H}\beta$.

En fait, lors de la mesure de spectres de R.M.N. de produits susceptibles d'exister sous diverses conformations et dans le cas où l'interconvertibilité de celles-ci est rapide dans les conditions utilisées (température, solvant), la valeur mesurée de $J_{\alpha\beta}$ correspond à la moyenne pondérée des J de chaque conformère. Cette valeur est donnée par l'équation :

$$J_{\alpha\beta} = mJ_G + nJ_T + pJ_G$$

dans laquelle m , n et p représentent les populations respectives des trois conformères ($m + n + p = 1$), J_G et J_T représentant la valeur de la constante de couplage entre les protons H_α et H_β , lorsqu'ils sont respectivement en position "gauche" et en position "trans" l'un par rapport à l'autre.

On sait en effet, comme l'a montré KARPLUS (44, 45), que la valeur de la constante de couplage entre deux protons vicinaux tels que H_α et H_β dépend principalement de l'angle dièdre qui les sépare.

PACHLER (46, 47) a montré que pour les acides α -aminés la dépendance angulaire des constantes de couplage vicinales pouvait être appliquée avec une très bonne approximation. Cet auteur propose dans le cas des acides α -aminés les valeurs :

$$J_T = 13,6\text{Hz}$$

$$J_G = 2,6\text{Hz}$$

également retenues par ABRAHAM (48) dans le cas de l'hydroxy-proline. Ainsi, dans le cas où la population des trois conformères est identique ($m = n = p = 1/3$), la valeur de $J_{\alpha\beta}$ qui peut être tirée de l'équation précédente est :

$$J_{\alpha\beta} = 6,25\text{Hz}.$$

Si les facteurs stériques sont prépondérants, la population du conformère a, considéré alors comme le plus stable, doit être supérieure à $1/3$. L'augmentation de la population du conformère a devrait ainsi provoquer une augmentation de la valeur moyenne de $J_{\alpha\beta}$ dans le cas d'un composé erythro ; une diminution de cette valeur devrait au contraire être observée dans le cas de l'isomère thréo.

La mesure de $J_{\alpha\beta}$, effectuée sur divers acides α -aminés β -hydroxylés thréo et erythro, ainsi que sur leurs chlorhydrates, infirme cette hypothèse : les valeurs de $J_{\alpha\beta}$ trouvées étant de l'ordre de 4 Hz dans tous les cas (tableau IX).

Même si l'on tient compte de la remarque de MARTIN (50), à savoir que les valeurs expérimentales de $J_{\alpha\beta}$ sont très souvent inférieures aux valeurs calculées et ceci à cause de légères variations de la valeur du dièdre $H_\alpha C_\alpha - C_\beta H_\beta$, ces mesures indiquent de toute façon un enrichissement des conformères dans lesquels H_α et H_β sont gauches, aussi bien dans le cas de l'isomère thréo, ce qui était attendu, que de l'isomère érythro.

Acides α -aminés β -hydroxylés	δ H α *	δ H β *	J _{Hα Hβ} **	Réf.
DL-thréo- β -hydroxy-leucine	4,22	3,91	3,5	49
DL-erythro- β -hydroxy-leucine	3,97	3,60	3,2	49
DL-thréo- β -phénylsérine	3,97	5,35	4,5	25
DL-erythro- β -phénylsérine	4,12	5,38	4	25
DL-thréonine	3,64	4,32	5	
DL-allo-thréonine	3,87	4,39	4	

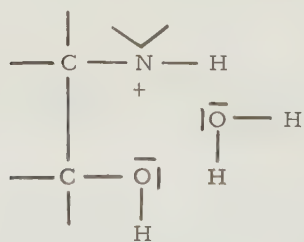
* exprimés en ppm

** exprimés en Hz

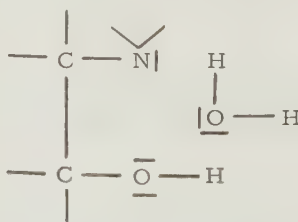
TABLEAU IX

En conséquence, dans le cas des acides α -aminés β -hydroxylés, ce ne sont pas les facteurs stériques qui règlent la proportion des divers conformères, mais l'existence de liaisons hydrogène entre la fonction NH₂ et la fonction OH.

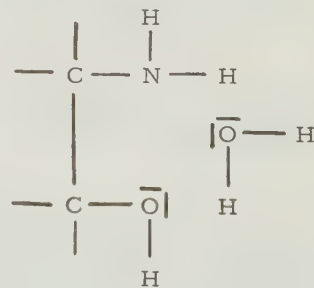
Au cours de diverses études sur les α -amino-alcools et les sels d'amines correspondants, l'existence de liaisons hydrogène a précisément été postulée pour expliquer certains phénomènes particuliers. PRELOG (51) notamment a envisagé dans ce cas trois types de liaisons hydrogène (I, II et III) avec participation du solvant :



I



II



III

Le type de liaison I stabilise la forme protonée de l'amine et les types II et III stabilisent l'amine libre.

SVOBODA (52) et SICHER (53) étudiant la basicité de ces α -amino-alcools ont repris l'hypothèse de PRELOG et évoqué la possibilité d'une stabilisation additionnelle de certains conformères par des liaisons hydrogène intramoléculaires de type $\text{NH} \dots \text{O}$.

Dans le cas des acides α -aminés β -hydroxylés, où le solvant est l'eau lourde, les résultats de R.M.N. observés sont en parfait accord avec l'hypothèse de PRELOG, compte tenu du fait que les protons des groupes OH , NH_2 et COOH s'échangent très rapidement avec l'eau lourde. Il a, en effet, été montré (54) que la liaison hydrogène formée avec le deutérium est plus forte que celle formée avec l'hydrogène.

Ces résultats peuvent très bien s'interpréter également, en ne considérant que l'effet de liaisons hydrogène intramoléculaires de type $\text{NH} \dots \text{O}$ pour les amines, ou de type $\text{N}^+ \text{H} \dots \text{O}$ pour les sels d'amines (55).

De toute façon, les valeurs de $J_{\alpha\beta}$ observées pour ces acides α -aminés β -hydroxylés sont également conformes aux mesures effectuées par divers chercheurs (50, 56, 57, 58, 59).

Cette discussion montre qu'il est impossible de déduire directement de la mesure de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ la configuration thréo ou erythro d'un acide α -aminé β -hydroxylé, alors que cela est possible dans le cas d'un β -hydroxy-ester (60, 61).

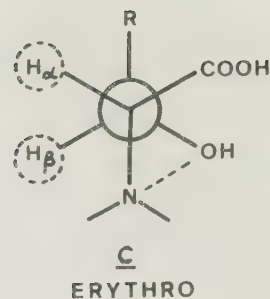
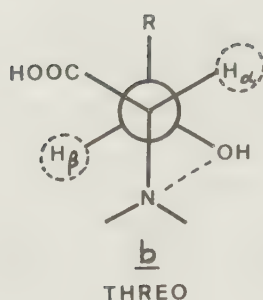
B - DETERMINATION DE LA CONFIGURATION THREO OU ERYTHRO DES ACIDES α -AMINES β -HYDROXYLES, PAR MESURE DU SPECTRE DE R.M.N. DE LEURS DERIVES N-DIMETHYLES -

La discussion précédente permet de tirer la conclusion suivante :

-pour qu'il soit possible de distinguer par R.M.N. un acide α -aminé β -hydroxylé de configuration thréo d'un isomère erythro, il faut que les répulsions stériques et l'établissement de liaisons hydrogène agissent dans le même sens, pour augmenter dans un cas la population du conformère dans lequel H_α et H_β sont trans, alors que dans l'autre cas les mêmes effets augmenteront la proportion de conformère ayant les protons H_α et H_β en position gauche.

Ceci a pu être réalisé en remplaçant la fonction NH_2 par $\text{N}(\text{CH}_3)_2$. Dans ce cas, en effet, on peut considérer que des trois groupes portés par C_α , c'est l'amine tertiaire qui présente l'encombrement stérique le plus important vis-à-vis du reste carboné R.

Il s'ensuit qu'il est possible de prévoir que le conformère thréo le plus stable sera alors b, avec H_α et H_β trans, tandis que le conformère erythro le plus stable sera c, avec H_α et H_β gauches :



De plus, il apparaît clairement que les liaisons hydrogène mentionnées précédemment contribueront également à stabiliser ces deux conformères.

Si cette hypothèse de travail est exacte, la mesure de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ doit donner une valeur comprise entre 6,25 et 13,6 Hz dans le cas du diastéréoisomère thréo, et entre 6,25 et 2,6 Hz dans le cas du diastéréoisomère érythro (Il est bien entendu que le calcul exact de l'angle dièdre $H\alpha C\alpha - C\beta H\beta$ par la méthode de KARPLUS ne peut avoir aucune signification).

Dans le but de vérifier l'exactitude de cette hypothèse, les dérivés N-diméthylés des DL-thréo et DL-érythro β -hydroxy-leucine, β -phénylsérine et thréonine, ont été préparés selon la méthode stéréospécifique de BOWMANN (11).

La mesure des spectres de R.M.N. effectués dans l'eau lourde, soit sur les bases, soit sur les chlorhydrates, confirme cette hypothèse (tableau X).

Dérivés N-diméthylés	$\delta H\alpha$ *		$\delta H\beta$ *		$J_{H\alpha H\beta}$ **	
	T	E	T	E	T	E
β -hydroxy-leucine	3,62	4,16	3,92	3,82	10	3
β -phénylsérine	3,87	3,74	5,04	5,36	9,8	4
thréonine	3,49	3,52	4,19	4,39	9,5	3,5

* exprimés en ppm

** exprimés en Hz

TABLEAU X

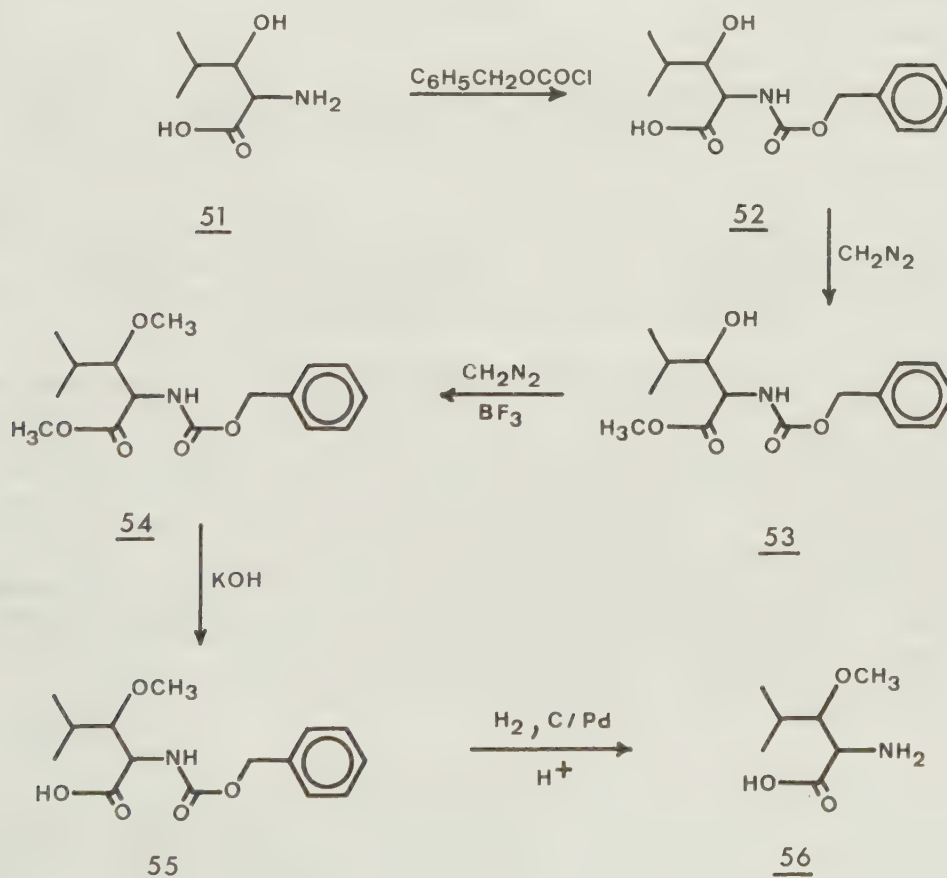
C - APPLICATION DE LA METHODE A UN ACIDE α -AMINE β -ETHERIFIE

Il semble donc possible d'attribuer une configuration thréo ou erythro à des acides α -aminés β -hydroxylés, par la mesure de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ de leurs dérivés N-diméthylés.

Cependant, pour appliquer cette méthode à la β -(p-tolyloxy)-leucine, 50, isolée, il convient de s'assurer auparavant que le passage d'une fonction alcool à une fonction éther n'entraîne pas une modification importante de la proportion des conformères dans l'un et l'autre cas. C'est dans ce but qu'a été entreprise la préparation d'un acide α -aminé β -éthérifié.

L'introduction stéréospécifique d'une fonction ether de phénol sur un acide α -aminé n'étant pas résolue, il est apparu qu'une bonne approximation pouvait être obtenue par la synthèse d'un acide α -aminé β -méthoxylé. En effet, les groupes OCH_3 et $\text{OC}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ peuvent être considérés comme pratiquement identiques au point de vue encombrement stérique, puisque dans les deux cas le substituant R reste le groupe le plus volumineux sur le carbone β .

De plus, la synthèse stéréospécifique d'un éther méthylique est sûre, elle a été réalisée à partir des DL-thréo et erythro β -hydroxy-leucines, 51 (49), selon le schéma suivant :



La méthylation stéréospécifique de la fonction alcool de 53 a été effectuée par le diazométhane, en présence d'éthérate de trifluorure de bore (62), selon la technique décrite par MÜLLER (63), après protection de la fonction NH_2 de 51 et esterification de la fonction COOH de 52 (schéma).

Les valeurs des constantes de couplage $J_{\alpha\beta}$ mesurées sur les spectres de R. M. N. (D_2O) des DL-thréo et erythro- β -méthoxy-leucines, 56, et sur les spectres de leurs dérivés N-diméthylés, sont données dans le tableau XI.

β -méthoxy-leucine	δ H α *		δ H β *		$J_{H\alpha H\beta}$ **	
	T	E	T	E	T	E
NH ₂	4, 17	4, 10	3, 65	3, 48	2, 5	3, 5
N(CH ₃) ₂	3, 98	4, 16	3, 70	3, 77	8, 5	3

* exprimés en ppm

TABLEAU XI

* * exprimés en Hz

L'examen de ces résultats permet de tirer les conclusions suivantes :

- 1) - Dans le cas d'un acide α -aminé β -éthérifié, les liaisons hydrogène règlent également la proportion des divers conformères. On peut, en effet, envisager des liaisons hydrogène de type $N-H \dots O$ ou $N^+H \dots O$, entre la fonction NH_2 (libre ou protonée) et le doublet de l'oxygène de la fonction éther (55).
- 2) - Il semble donc que l'on dispose d'une méthode permettant de déterminer la configuration thréo ou erythro d'un acide α -aminé β -éthérifié.

Cette méthode, appliquée à la β -(p-tolyloxy)-leucine, 50, d'origine naturelle, permet d'attribuer à celle-ci, donc au fragment B de la lasiodine B, la configuration ERYTHRO. En effet, la valeur mesurée de la constante de couplage $J_{\alpha\beta}$ est 2,5Hz.

Comme il a été dit au début, cette étude par R.M.N. peut être considérée comme une bonne indication de la configuration du fragment isolé, elle demande à être confirmée par la synthèse stéréospécifique de la β -(p-tolyloxy)-leucine qui permettrait d'établir en outre la configuration absolue de 50.

— — — — —

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion, pris en tube capillaire, sont corrigés. Les pouvoirs rotatoires ont été déterminés avec le Quick-polarimètre électronique Jouan-Roussel, à une concentration voisine de 1% et une température voisine de 20°. Les spectres U.V. ont été exécutés en solution dans l'éthanol à l'aide du spectrophotomètre Unicam SP 100. Les spectres I.R. ont été déterminés sur spectrographe Perkin-Elmer, modèle 257, ou Infracord.

Les spectres de R.M.N. ont été effectués avec un spectromètre Varian A-60 ; les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, le signal du tétraméthylsilane étant pris comme zéro de référence, et les constantes de couplage en Hertz.

Les spectres de masse ont été mesurés sur un spectrographe MS 9. Les analyses ont été effectuées dans le laboratoire de Microanalyse du C.N.R.S. à Gif s/Yvette. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été exécutées sur Kieselgel-G neutre, sauf indication contraire. Le solvant de migration utilisé pour les acides aminés, les aminophénols et les peptides est un mélange ammoniacal, éthanol absolu, chlorure de méthylène (15/40/60). Les acides aminés et les aminophénols sont révélés par une solution alcoolique de ninhydrine à 0,2%. Dans tous les autres cas, la révélation est obtenue par pulvérisation successive de la plaque avec le réactif de Dragendorff et une solution d'acide sulfurique à 50%.

Les chromatographies sur colonne sont exécutées sur silice dite "4 minutes", spécialement préparée à cet effet (64, 65), ou sur acide silicique Mallinckrodt CC-7 100-200 mesh.

L'extraction du milieu réactionnel est généralement effectuée à l'aide d'un solvant organique. La phase organique, séparée par décantation, est lavée à l'eau jusqu'à neutralité, puis à l'eau saturée de chlorure de sodium, séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec sous pression réduite. Lorsque l'extraction est effectuée selon cette technique, il n'est fait mention que du solvant utilisé.

EXTRACTION ET SEPARATION DES ALCALOÏDES

1) - Hymenocardia acida -

25kg d'écorces de racines pulvérisées sont alcalinisés par une solution d'ammoniaque à 40% et épuisés à l'appareil de Soxhlet par 100 litres d'éther sulfurique. La phase organique est concentrée à 10 litres et soumise à une extraction par une solution saturée d'acide sulfamique jusqu'à réaction de Mayer négative. La solution aqueuse est additionnée d'un excès d'ammoniaque et les bases libérées sont extraites au chlorure de méthylène. On obtient ainsi 6,5g d'alcaloïdes bruts qui sont chromatographiés sur 200g d'un mélange acide silicique/célite (2/1). Au chlorure de méthylène contenant 5% de méthanol, on élue 5,200g d'hymenocardine présentant une seule tache en chromatographie sur plaque.

2) - Lasiodiscus marmoratus -

23kg de feuilles pulvérisées sont alcalinisés par une solution d'ammoniaque à 40% et extraites dans un appareil de Soxhlet par 120 litres d'éther sulfurique. La phase organique est soumise sans concentration à une extraction par une solution saturée d'acide sulfamique jusqu'à réaction de Mayer négative (environ 35 litres). La solution aqueuse est additionnée d'un excès d'ammoniaque et les bases libérées sont extraites au chlorure de méthylène. On obtient ainsi 41g d'alcaloïdes bruts qui sont chromatographiés sur 850g de florisil 100/200 mesh. L'éluat est recueilli par fractions de 500cm³.

Solvant	Fractions	Poids	(CCM) tache principale
CH ₂ Cl ₂	1	3,10	
-	2-18	8,35	Lasiodine A
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 0,5%	19-21	7,42	Lasiodine A + B
-	22-24	9,10	Lasiodine B (pure en CCM)
-	25	6,51	Lasiodine B
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 1%	26	2,38	

Les fractions 2-18 sont reprises par de l'éther et donnent 3,10g de lasiodine A blanche, cristallisée, F = 192°, pure en CCM. Les fractions 19-21 sont chromatographiées à nouveau sur 150g de florisil, l'éluat étant recueilli par fractions de 200cm³.

Solvant	Fraction	Poids	CCM (tache principale)
CH ₂ Cl ₂	1	0,200	
	2- 7	2,55	Lasiodine A (pure en CCM)
	8-15	0,30	Lasiodine A
CH ₂ Cl ₂ 0,5%	16-21	1,07	Lasiodine A + B
	22-25	3,410	Lasiodine B

3) - Waltheria americana -

60kg de plante entière pulvérisée sont alcalinisés par une solution de carbonate neutre de sodium. On extrait à l'appareil de Soxhlet par du benzène. L'extrait benzénique est évaporé à sec et repris par du méthanol ; on sépare ainsi 1,5g d'une fraction insoluble. La fraction soluble dans le méthanol correspond à 56kgs d'extrait. Le résidu méthanolique, repris par CH₂Cl₂, est additionné de deux volumes d'éther et extrait par une solution d'acide sulfamique. Les solutions acides aqueuses réunies sont alcalinisées par de l'ammoniaque puis extraites par CH₂Cl₂ ; la phase organique évaporée à sec donne 29,5g d'alcaloïdes bruts.

Les bases brutes sont chromatographiées sur 850g de silice-célite et l'éluat est recueilli par fractions de 800cm³.

Solvant	Fraction	Poids	Chromato- plaque	
CH ₂ Cl ₂	1- 5	0,250	0	non alcaloïdique
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 1%	6-16	1,300	Y + Z	
	17-22	8	Y + Z + X	
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 5%	23-29	9,600	X + Z	

Dans les différentes fractions de chromatographie, on sépare les alcaloïdes faiblement solubles dans le méthanol : adouétines X et Y et l'on met à profit la solubilité de l'adouétine Z dans l'hexane pour assurer sa séparation.

4) - Myrianthus arboreus -

a) Feuilles récoltées en Guinée : 7,5kg de feuilles pulvérisées et alcalinisées par une solution d'ammoniaque à 40% sont extraits au Soxhlet par 25 litres d'éther sulfurique. On concentre à 2 litres environ et extrait par une solution saturée d'acide sulfamique. La solution sulfamique est ensuite alcalinisée à l'ammoniaque et

extraite à l'éther. La solution étherée, lavée et séchée, est évaporée à sec. Le résidu est repris par l'acétone. Les alcaloïdes bruts s'insolubilisent rapidement. Le précipité blanc ainsi obtenu (0,450g) est chromatographié sur 18g de silice. Au chlorure de méthylène contenant 2% de méthanol, on élue 0,303g d'alcaloïdes qui présentent en CCM une tache principale correspondant à la myrianthine A. Une nouvelle chromatographie sur silice permet d'obtenir une myrianthine A (0,140g) pure en CCM.

b) Feuilles récoltées au Congo Kinshasa : 1kg de feuilles pulvérisées et alcalinisées par une solution d'ammoniaque à 40% sont extraites au Soxhlet par 5 litres d'éther sulfurique. On concentre à 1 litre environ et épuise par une solution d'acide acétique à 10%. La solution acétique est alcalinisée par de l'ammoniaque et extraite à l'éther. La solution étherée, lavée et séchée, est concentrée. Les alcaloïdes bruts (0,280g) cristallisent. Ils sont chromatographiés sur silice (11g), l'éluat étant recueilli par fractions de 100cm³ :

Solvant	Fractions	Poids	Chromatoplaque
CH ₂ Cl ₂	1- 4	0,015g	
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 1%	5- 6	0,039g	Myrianthine B pure
	7- 9	0,045g	Myrianthine B + C
	10-16	0,134g	Myrianthine C pure
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 2%	17-22	0,031g	

15 Hymenocardine

0,300g du produit issu de la chromatographie ci-dessus sont cristallisés deux fois dans l'acétone, $F = 261^{\circ}$, $[\alpha]_D = 124^{\circ}$ (CHCl₃).

Analyse : C₃₇H₅₀O₆N₆.H₂O

calc. %	C 64,14	H 7,57	N 12,13	O 16,17
tr. %	64,33	7,50	11,94	15,82

Spectre I.R. : -CO-NH- à 3280, 1635, 1520cm⁻¹ ;
C=O à 1700cm⁻¹.

Spectre U.V. : max λ 222nm (log ϵ 4,66), 263 (4,17), 289 (4,02).

Spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) : 12 protons, 4 CH_3 aliphatiques, entre 0,7 et 1,1ppm ; 6 protons, 2 $\underline{s}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CR}_2$ à 1,48 et 1,94ppm ; 6 protons, $\underline{s}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,30ppm ; 13 protons, protons aromatiques et CONH entre 6,67 et 7,95ppm ; - dans CF_3COOH : 6 protons pic large, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,18ppm.

Spectre de masse : pic M^+ = 674.

Oxalate d'hyménocardine

0,160g d'hyménocardine sont dissous dans 4cm^3 d'acétone et additionnés d'une solution de 0,030g d'acide oxalique dans 1cm^3 d'acétone. Le précipité d'oxalate brut obtenu est cristallisé deux fois dans un mélange méthanol/acétone, F 225°.

Analyse : $\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{O}_9\text{N}_6, 2 \text{H}_2\text{O}$

calc. %	C 59,83	H 6,95	N 10,72	O 22,48
tr. %	59,34	7,01	10,36	22,20

Hyménocardinols

0,050g d'hyménocardine sont dissous dans 5cm^3 de méthanol. A cette solution, on ajoute, en une demi-heure, par petites portions et sous agitation magnétique, 0,050g de borohydrure de sodium. L'agitation est continuée pendant une heure, puis le milieu réactionnel est dilué à l'eau et extrait au chlorure de méthylène. Le résidu d'extraction est constitué par un mélange donnant en chromatographie sur plaque deux taches très proches de R_f inférieur à celui de l'hyménocardine ; ce mélange correspond aux deux alcools épimères formés.

Spectre U.V. : max λ 222, 281, 290nm.

Spectre I.R. : CONH à 3290, 1635, 1500cm^{-1} ;
absence de bande C=O.

Spectre de R.M.N. : ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) : 12 protons, 4 CH_3 aliphatiques entre 0,7 et 1,1ppm ; 6 protons, 2 $\underline{s}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CR}_2$ à 1,46 et 1,91ppm ; 6 protons $\underline{s}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,33ppm ; 13 protons, protons aromatiques entre 6,83 et 7,55ppm.

Spectre de masse : pic M^+ 676.

Hydrolyse acide de l'hymenocardine

A 1g d'hymenocardine, dissous dans 25cm³ d'acide acétique, on ajoute 25cm³ d'eau et 50cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On porte à ébullition à reflux pendant 8 heures sous azote et on évapore à sec. Le résidu est dissous dans 15 à 20cm³ d'alcool absolu, additionné de 10 à 15cm³ de benzène et évaporé à sec à nouveau. On répète ces dernières opérations plusieurs fois jusqu'à disparition de l'odeur d'acide chlorhydrique. Finalement, le résidu est repris par 60cm³ d'eau et la solution est passée sur une colonne de 30cm³ d'amberlite IR 120 en phase acide. La résine est ensuite lavée avec 100cm³ d'eau. Les solutions, recueillies au bas de la colonne de résine, sont évaporées à sec et fournissent 0,190g de produits acides brun foncé.

Les produits fixés par la résine sont élués par 1,5 litre d'ammoniaque à 3%. La solution alcaline est évaporée à sec. Le résidu, soit 0,670g, est dissous dans 80cm³ d'eau et passé sur une colonne de 25cm³ d'amberlite IRC 50 en phase acide. La colonne est lavée à l'eau. La solution, qui a traversé la colonne et les eaux de lavage réunies à sec, fournit un résidu de 0,484g. Les produits fixés par la résine sont élués par de l'ammoniaque à 3% et pèsent 0,153g.

Les produits amphotères, non fixés par la résine carboxylique (0,484g) sont analysés par chromatographie sur plaque ; on obtient, après révélation par la ninhydrine une seule tache de même R_f que le tryptophane et, après révélation par le réactif de Dragendorff/acide sulfurique, une tache principale, de R_f légèrement supérieur à celui du tryptophane qui correspond à la L-(N-diméthyl)-isoleucyl-L-valine. On chromatographie ces produits sur 20g de silice, l'éluat étant recueilli par fractions de 100cm³ :

Solvant	Fractions	Poids	CCM
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 20%	1- 2	0,034g	une tache principale (Dragendorff/ H ₂ SO ₄) tryptophane (ninhydrine)
	3- 7	0,155g	
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 50%	8-15	0,160g	
	16-17	0,075g	

3 et 7 Chlorhydrate de p-hydroxy-ω-amino-acétophénone

1°) - A partir de l'hymenocardine : les produits élués de la résine carboxylique par l'ammoniaque (0,153g) sont dissous dans 15cm³ d'alcool absolu et acidifiés par de l'acide chlorhydrique concentré. Après élimination de l'excès d'acide et évaporation à sec, le résidu est cristallisé dans l'alcool absolu. On obtient 0,025g de chlorhydrate, F 253° (déc.).

Analyse : C₈H₉O₂N.HCl

calc. %	C 51,21	H 5,37	N 7,46	O 17,06	Cl 18,89
tr. %	51,31	5,39	7,20	17,11	18,77

Spectre I.R. : C=O à 1665cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (eau lourde) : 2 protons, s, $-\text{CH}_2-$, à 4,62ppm ; 4 protons, système A_2B_2 ($J_{\text{AB}}=9\text{Hz}$), noyau benzénique paradisubstitué entre 6,73 et 7,91ppm.

2°) - Synthèse : 3,50g de phénol sont condensés avec 1,960g de chlorhydrate d'amino-acétonitrile préparé d'après T. CURTIUS (66) dans le nitrobenzène en présence de AlCl_3 selon le mode opératoire décrit par M. ASSCHER (10). On obtient ainsi 3g de chlorhydrate de p-hydroxy- ω -amino-acétophénone, F 251° (déc.). Spectres I.R. et de R.M.N. identiques à ceux du produit obtenu à partir de l'hymenocardine.

8 L-tryptophane

Les fractions 8-15 éluées de la colonne de silice lors de la chromatographie des produits d'hydrolyse acide de l'hymenocardine non retenus par la résine carboxylique, sont cristallisées dans l'alcool absolu. On obtient 0,038g de L-tryptophane, $[\alpha]_{\text{D}} - 32^\circ$ (eau), spectre I.R. superposable à celui d'un échantillon de référence.

9b Ester méthylique de la N-diméthyl-L-isoleucyl-L-valine

1°) - A partir de l'hymenocardine : les fractions 3-7 éluées de la colonne de silice au cours de la chromatographie des produits d'hydrolyse acide de l'hymenocardine, non retenus par la résine carboxylique, sont dissoutes dans 2cm^3 de méthanol et additionnées de 10cm^3 de solution étherée de diazométhane. Après une nuit à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 4,5g d'alumine. On élue, en tête, au benzène, 0,109g d'ester qui sont cristallisés dans l'éther de pétrole, F 68° , $[\alpha]_{\text{D}} - 10^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{N}_2$

Calc. %	C 61,73	H 10,36	N 10,28
Tr. %	61,95	10,26	9,90

Spectre I.R. (CCl_4) : CO-NH à 3390 et 1695cm^{-1}
ester à 1750cm^{-1}

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 12 protons, 4 CH_3 aliphatiques entre 0,84 et 1,07ppm ; 6 protons, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,29ppm ; 1 proton, d ($J=5\text{Hz}$), $-\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,59ppm ; 3 protons, s, $-\text{COOCH}_3$, à 3,74ppm ; 1 proton, q ($J=4,5$, $J'=9\text{Hz}$), $-\text{CH}-\text{COOCH}_3$, à 4,53ppm ; 1 proton, pic large, $-\text{CO-NH-}$ à 6,9ppm.

Spectre de masse : M^+ 272.

2°) - Synthèse : 0,210g de L-(N-diméthyl)-isoleucine sont dissous dans 30cm³ d'un mélange chlorure de méthylène/chloroforme (1/1), puis additionnés de 0,6cm³ de triéthylamine et de 0,4cm³ de chloroformiate d'éthyle. Après 15mn de contact à la température ambiante, on ajoute une solution de 0,210g d'ester méthylique de la L-valine dans 8cm³ de chloroforme ; on laisse reposer 15mn, puis chauffe à reflux pendant 5 mn. La solution chloroformique est ensuite extraite par 60cm³ d'acide chlorhydrique. Les phases chlorhydriques sont lavées à l'eau, puis alcalinisées par du carbonate disodique et, enfin extraites par de l'éther. Le résidu (0,070g) est chromatographié sur silice. Les fractions éluées par du benzène contenant 10% de chloroforme (0,040g) sont sublimées, F 65°, $[\alpha]_D - 10^\circ$ (CHCl₃). Spectres I.R. et de R.M.N. identiques à ceux du produit obtenu à partir de l'hymenocardine.

11 N-diméthyl-L-isoleucine

2g de L-isoleucine, dissous dans 150cm³ d'un mélange de méthanol et d'eau (50/50), sont additionnés de 7cm³ de solution de formol à 30% en présence de 2g de charbon palladié à 10%, et hydrogénés une nuit à la température ambiante et à la pression atmosphérique. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée, la solution filtrée et évaporée à sec. L'excès de formol est éliminé par évaporation de petites quantités d'eau ajoutées au résidu. Le produit obtenu est cristallisé dans un mélange méthanol/acétone (1,570g), F = 174°, $[\alpha]_D + 50^\circ$ (méthanol, c = 2). Les spectres I.R. et de R.M.N. sont identiques à ceux d'un échantillon de référence.

13 Ester méthylique de la L-valine

Sur 1g de L-valine dissous dans 50cm³ de méthanol anhydre, on fait passer pendant 1 h. 30 et à froid un courant d'HCl gazeux anhydre. Le milieu réactionnel est ensuite porté à ébullition à reflux pendant 1 h. 30. Après évaporation de la majeure partie du solvant sous pression réduite, le milieu est dilué par de l'eau, alcalinisé par de la soude et extrait à l'éther. Le résidu d'extraction (0,420g) présente des spectres I.R. et de R.M.N. identiques à ceux d'un échantillon de référence.

Hydrolyse alcaline de l'hymenocardine

1,800g d'hymenocardine sont dissous dans 24cm³ de méthanol et additionnés d'une solution de 5g de soude en pastilles dans 6cm³ d'eau. On obtient ainsi une solution alcaline environ 4n qui est portée à ébullition à reflux pendant 15 heures sous azote. Après évaporation du méthanol sous vide, le milieu réactionnel est dilué à l'eau, acidifié par de l'acide chlorhydrique et extrait à l'éther. La solution étherée, évaporée à sec, fournit 0,070g de produits acides bruns. La solution aqueuse est neutralisée par de l'ammoniaque, puis évaporée à sec sous vide. Le résidu est épuisé par 150cm³ d'un mélange chloroforme/alcool (85/15). La solution organique est mise à sec et les chlorhydrates obtenus (1,518g), qui ne contiennent plus de chlorures minéraux, sont dissous dans 300cm³ d'eau. Cette solution aqueuse est passée sur 200cm³ d'amberlite IR 120 en phase acide. La colonne de résine est lavée à l'eau, puis les produits fixés sont élués par 3 litres d'ammoniaque à 3%. La solution alcaline est évaporée à sec. Le résidu, soit 1,336g, est chromatographié sur 53g de silice, l'éluat étant recueilli par fractions de 150cm³.

Solvant	Fractions	Poids	Chromatoplaque
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 10%	1-10	0,150g	1 tache principale (Draggendorf/H ₂ SO ₄)
- - 20%	11-20	0,991g	

19 Ester méthylique du tétrapeptide

Les fractions 11-20 (0,991g), après dissolution dans 5cm³ de méthanol, sont additionnés de 20cm³ de solution étherée de diazométhane. On laisse reposer 4 heures à la température ambiante, puis on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 40g d'alumine. Les fractions éluées en tête par de l'éther contenant 2% d'alcool (soit 0,260g) ne présentent qu'une seule tache en chromatographie sur plaque. Elles sont cristallisées dans l'acétone/hexane, puis dans l'acétone, F peut net 100-160°.

Analyse : C₃₀H₄₅O₅N₅

calc. %	C 64,84	H 8,16	N 12,60	O 14,40
tr. %	64,19	8,17	12,55	14,60

Spectre U. V. : max λ 222 nm (log ϵ 4,75), 283 (3,83), 291 (3,77).

Spectre I. R. : CO-NH à 3280, 1635, 1510cm⁻¹
ester à 1745cm⁻¹.

Spectre de R. M. N. (CDCl₃) : 12 protons, 4 CH₃ aliphatiques entre 0,73 et 1,08ppm ; 6 protons, 2 s, (CH₃)₂C=, à 1,70 et 2ppm ; 6 protons, s, -C(CH₃)₂, à 2,22ppm ; 1 proton, d, (J=4,5Hz), -CH-N(CH₃)₂ à 2,63ppm ; 2 protons, d (J=6Hz), -CH₂-, à 3,32ppm ; 3 protons, s, -COOCH₃ à 3,63ppm ; 1 proton, m, -CH-NH-, entre 3,95 et 4,30ppm ; 1 proton, m, -CH-NH-, entre 4,62 et 5,10ppm ; 8 protons, protons aromatiques et -CO-NH- entre 6,88 et 7,62ppm ; 1 proton, pic large, -NH-C= à 8,75ppm.

Spectre de masse : M⁺ 555.

18 Anisate de méthyle

Après hydrolyse alcaline de l'hymenocardine (voir ci-dessus), le résidu (0,070g) de l'extraction par l'éther en milieu acide est dissous dans 1cm³ de méthanol et additionné de 5cm³ de solution étherée de diazométhane. Après une nuit de repos, on évapore à sec

et chromatographie le produit obtenu sur 2,200g d'alumine. On élue en tête au mélange benzène/hexane (50/50) 0,015g d'anisate de méthyle pur. Les spectres I.R. et de R.M.N. de ce produit sont superposables à ceux d'un échantillon de référence.

21 Hydrolyse acide du produit 19 et 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acide α -céto-isovalérianique

0,200g d'ester méthylique du tétrapeptide, 19, sont dissous dans 20cm³ d'acide chlorhydrique 6n. On porte à ébullition à reflux pendant 1 heure sous azote. Le milieu réactionnel est analysé par chromatographie sur plaque. On obtient, après révélation par la ninhydrine, une seule tache de même Rf que le tryptophane et, après révélation par le réactif de Dragendorff sulfurique, une tache principale de même Rf que la L-(N-diméthyl)-isoleucyl-L-valine. On neutralise partiellement par 6cm³ d'ammoniaque, extrait à l'éther, et le résidu est dissous dans 2cm³ d'eau. Cette solution est ajoutée à 8cm³ d'une solution de 2,4-dinitro phénylhydrazine à 2,5% dans l'acide chlorhydrique 2n. Après 1 heure de repos, le précipité de 2,4-dinitro-phénylhydrazone est essoré, séché (poids = 0,030g) et cristallisé dans l'acétate d'éthyle. On obtient 0,010g de produit F = 197°, spectre I.R. et Rf en chromatographie sur plaque (67) (solvant de migration : éther de pétrole/formiate d'éthyle/acide acétique 13/7/0,6) identiques à ceux d'un échantillon, F = 199°.

37 Lasiodine A

Un échantillon cristallisé pour analyse dans l'acétone présente les constantes suivantes : F = 195°, $[\alpha]_D + 38^\circ$ (CHCl₃).

Analyse : C₃₉H₄₉O₇N₅

calc. %	C 66,93	H 7,06	O 16,00	N 10,01
tr. %	66,90	6,97	16,27	9,77

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; $\lambda_{\max}$ 281nm, log ϵ 4,49.

Spectre I.R. (nujol) : H mobiles à 3300 et 3220cm⁻¹ ; amides à 1700, 1650 et 1515cm⁻¹ ; ester à 1750cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. :

1°) - CDCl₃ : 6 protons, deux doublets (J=6,7Hz) des méthyles du groupe isopropyle à 0,69 et 0,82ppm ; 6 protons, singulet correspondant à un N-CH₃ et à un des méthyles du groupe (CH₃)₂C=, à 1,80ppm ; 3 protons, singulet du deuxième méthyle du groupe (CH₃)₂C=, à 1,93ppm ; 6 protons, singulet de N(CH₃)₂ à 2,73ppm ; 1 proton, doublet (J=6Hz) de l'hydrogène en α d'un groupe N-CH₃ à 2,90ppm ; 1 proton, doublet (J=6,5Hz) de l'hydrogène en α du deuxième groupe N-CH₃ à 3,37ppm ; 2 protons, hydrogènes en α d'hétéroatomes à 5,17ppm ; 1 proton, doublet (J=9,5Hz) d'un H vinylique à 5,83ppm ; 18 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,6 et 7,5ppm.

- 2°) - CDCl_3 additionné d'une goutte de CF_3COOH : 6 protons, 2 doublets ($J=6,7\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle, à 0,84 et 1,03ppm ; 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=$ à 1,52 et 1,88ppm ; 9 protons, pic large des groupes N-CH_3 à 3,0ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 593.

O-méthyl-lasiodine A

0,400g de lasiodine A sont dissous dans 1cm^3 de méthanol et additionnés de 10cm^3 de solution étherée de diazométhane. Après 1 heure 30 de contact à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 16g de silice. On élue, en tête, au chloroforme 0,334g de produit pur en CCM, qui sont cristallisés dans l'acétone, $F = 188^\circ, [\alpha]_D + 53^\circ (\text{CHCl}_3)$.

Analyse : $\text{C}_{40}\text{H}_{51}\text{O}_7\text{N}_5$

calc. %	C 67,30	H 7,20	O 15,70	N 9,81
tr. %	67,11	7,24	15,67	9,75

Spectre U. V. : forte absorption terminale de type aromatique ; λ_{max} 283nm, $\log \epsilon$ 4,45.

Spectre I. R. (CHCl_3) : H mobiles à 3380, 3420 et 3270cm^{-1} ; amides à 1690, 1650 et 1515cm^{-1} ; ester à 1745cm^{-1} .

Spectre de R. M. N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 doublets ($J=6,7\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle à 0,70 et 0,85ppm ; 6 protons, 2 singulets du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=$ à 1,80 et 1,92ppm ; 3 protons, singulet du N-CH_3 à 1,88ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,45ppm ; 1 proton, doublet ($J=6\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du N-CH_3 à 2,63ppm ; 1 proton, doublet ($J=7\text{Hz}$) de l'H en α du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,72ppm ; 2 protons en α d'hétéroatomes à 5,07ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un hydrogène vinylique à 5,82ppm ; 18 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,60 et 7,50ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 607 ; pics à m/e 476, 417, 328, 300, 294, 182, 149, 106-105, 91, 86, 77, 58.

O,N-diacétyl-O-méthyl-lasiodine A

0,130g de O-méthyl lasiodine A sont dissous dans $0,5\text{cm}^3$ de pyridine et additionnés de $0,5\text{cm}^3$ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on dilue à l'eau glacée, alcalinise par l'ammoniaque et extrait au chloroforme. Le résidu (0,140g) est chromatographié sur 5,6g de silice. On élue, en tête, au chloroforme 0,090g de produit pur en CCM, mais qui ne cristallise pas.

Spectre U. V. : forte absorption terminale de type aromatique ; $\lambda_{\max}$ 284nm ; $\log \epsilon$ 4,27.

Spectre I. R. (CHCl_3) : CO-NH à 3410, 3300, 1680, 1650 et 1515cm^{-1} ; ester à 1745cm^{-1} .

Spectre de R. M. N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 doublets ($J=6,7\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle, à 0,79 et 0,89ppm ; 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=$ à 1,61 et 1,74ppm ; 3 protons, singulet du O-CO- CH_3 à 1,99 ppm ; 3 protons, singulet du N-CO- CH_3 à 2,11ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,22ppm ; 3 protons, singulet du N- CH_3 à 2,88ppm ; 1 proton, doublet ($J=7,6\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,30ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,77ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un H vinylique à 5,94ppm ; 18 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,5 et 7,4ppm.

Spectre de masse : pic M^+ = 797 ; pic à m/e 737 ($\text{M}-60$).

Dihydro-N-méthyl lasiodine A

0,200g de lasiodine A sont dissous dans 10cm^3 d'alcool absolu et hydrogénés en présence de 0,200g de charbon palladié et de 2cm^3 de formol à 30%, pendant 48 heures, à la température ambiante et à la pression atmosphérique. Le charbon est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est dissous dans du chloroforme, la solution est lavée à l'eau ammoniacale et évaporée à sec. On obtient 0,167g de produit qui sont chromatographiés sur 7g de silice. On élue par du chloroforme contenant 1% de méthanol, 0,126g de dihydro-N-méthyl lasiodine A, pur en CCM, qui sont cristallisés dans l'alcool absolu, $F = 144^\circ$, $[\alpha]_D + 39^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{40}\text{H}_{53}\text{O}_7\text{N}_5$, $1/2 \text{H}_2\text{O}$

calc. %	C 66,28	H 7,51	O 16,55	N 9,66
tr. %	66,09	7,64	16,71	9,27

Spectre U. V. : épaulement λ 227nm, $\log \epsilon$ 4,62 ; $\lambda_{\max}$ 278nm, $\log \epsilon$ 3,64 ; 286 (3,55).

Spectre I. R. (CHCl_3) : CO-NH à 3310, 1670, 1510cm^{-1} ; ester à 1740cm^{-1} .

Spectre de R. M. N. (CDCl_3) : 6 protons, deux doublets ($J=7\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle à 0,75 et 0,97ppm ; 6 protons, singulet d'un $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 1,75ppm ; 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=$ à 1,80 et 1,92ppm ; 3 protons, singulet d'un $\text{N}(\text{CH}_3)$ à 2,41ppm ; 1 proton, doublet ($J=5,5\text{Hz}$) de l'H en α d'un $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,15ppm ; 1 proton, doublet ($J=5,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH à 5,12ppm ; 17 protons, cycles benzéniques et CONH entre 6,6 et 7,6ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 609 ; pics à m/e 464, 406, 346, 328, 300, 282, 182, 155 ; m/e 107 ; m/e 106-105, 100. (86 + 15), 91, 77, 58.

N-acétyl tyramine

0,200g de tyramine sont dissous dans 5cm³ de méthanol et additionnés de 0,75 cm³ d'anhydride acétique, après une heure de contact à la température ambiante, on évapore à sec ; on dissout plusieurs fois le résidu dans un mélange chloroforme/méthanol en évaporant à sec à chaque fois, pour éliminer l'excès d'anhydride acétique. Finalement, on cristallise dans l'acétone, F = 133°, J. COMIN et coll. (68) donnent 134-135°.

Analyse : C₁₀H₁₃O₂N

calc. %	C 67,02	H 7,31	N 7,82
tr. %	66,89	7,08	7,95

Spectre U.V. : $\lambda_{\max}$ 226nm, log ϵ 4,21 ; 280 (3,40) ; 286 (3,33).

Spectre I.R. (nujol) : CO-NH à 3340, 1635 et 1520cm⁻¹.

22 N-méthyl L-valine

La solution aqueuse ammoniacale, séparée par décantation de la phase chloroformique, selon le mode opératoire décrit pour le produit 23a, est évaporée à sec. On obtient 0,038g de N-méthyl L-valine qui sont sublimés à 160°, F > 300°, [α]_D + 33°5 (HCl 6n). P. QUITT et coll. (23) donnent + 33°1.

Analyse : C₆H₁₃O₂N

calc. %	C 54,94	H 9,99	N 10,68
tr. %	55,10	9,75	10,84

Spectre de R.M.N. du chlorhydrate dans D₂O : 6 protons, 2 doublets (J=7Hz) du groupe isopropyle à 0,91 et 0,94ppm ; 3 protons, singulet du NCH₃ à 2,61ppm ; 1 proton, doublet (J=4,5Hz) de l'hydrogène en α du NCH₃ à 3,30ppm.

Hydrogénation catalytique de la lasiodine A

23a N-diméthyl β -phénylséryl-valyl-phénylalaninyl-tyramine

0,250g de lasiodine A sont dissous dans 20cm³ d'alcool absolu et hydrogénés en

présence de 0,125g de charbon palladié à la température ambiante et à la pression atmosphérique pendant 60 heures. Le charbon est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé à sec. Le résidu est repris par un mélange de chloroforme et d'une solution très diluée d'ammoniaque. La phase chloroformique est séparée, lavée, séchée et évaporée à sec, elle fournit 0,198g de produit qui sont chromatographiés sur 7,6g de silice. Par du chloroforme contenant 2% de méthanol, on élue 0,133g du dérivé 23a purs en CCM, qui sont cristallisés dans l'acétone, $F = 186^\circ$, $[\alpha]_D + 25^\circ$ (CHCl_3 , CH_3OH 1/1).

Analyse : $\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{N}_4$

calc. %	C 68,96	H 7,32	O 13,92	N 9,75
tr. %	68,93	7,35	13,93	9,64

Spectre U. V. : épaulement λ 225nm, $\log \epsilon$ 4 ; λ_{max} 278nm, $\log \epsilon$ 3,20 ; 286 (3,11).

Spectre I. R. (nujol) : H mobiles à 3180cm^{-1} ; amides à 1640, 1550 et 1520cm^{-1} .

Spectre de R. M. N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 doublets ($J=6,5\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle, à 0,73 et 0,78ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,38ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 4,03ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH à 5,07ppm ; 16 protons cycles benzéniques et CO-NH entre 6,6 et 7,5ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 468.

Hydrolyse acide de la N-diméthyl- β -phénylséryl-valyl-phénylalanine, 23a :
24, p-tyramine, 25, D-phénylalanine

A 0,385g de dérivé 23a, dissous dans 10cm^3 d'acide acétique, on ajoute 20cm^3 d'acide chlorhydrique concentré et 10cm^3 d'eau. On porte à ébullition à reflux pendant 5 heures, puis on évapore à sec. On reprend plusieurs fois avec de l'alcool absolu, en évaporant à chaque fois la solution obtenue à sec, pour éliminer l'excès d'acide chlorhydrique. Finalement, on reprend par 15cm^3 d'eau et cette solution aqueuse est alcalinisée par l'ammoniaque, extraite au chloroforme pour éliminer les produits basiques, puis mise à sec. Le résidu est dissous, à nouveau, dans 15cm^3 d'eau et la solution obtenue est passée sur une colonne de 20cm^3 d'amberlite IR 120 en phase acide. La résine est ensuite lavée avec 100cm^3 d'eau. Les produits fixés par la résine sont élués par 700cm^3 d'ammoniaque à 3%. La solution alcaline, évaporée à sec, fournit 0,260g de produits qui sont repris par de l'alcool absolu. On obtient ainsi 0,016g de D-phénylalanine, insolubles dans ce solvant, $[\alpha]_D + 32^\circ$, spectre I. R. et Rf en CCM identiques à ceux d'un échantillon de référence. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu, dissous dans 15cm^3 d'eau est passé sur une colonne de 12cm^3 d'amberlite IRC 50 en phase acide. La colonne est lavée à l'eau. La solution passée et les eaux de lavage sont évaporées et fournissent 0,153g de produits.

D'autre part, on élue, par 400cm³ d'ammoniaque, les produits fixés par la résine (0,102g).

Les produits amphotères, non fixés par la résine (0,153g), donnent en CCM, après révélation par la ninhydrine, une tache faible de même Rf que la phénylalanine et, après révélation par le réactif de Dragendorff/acide sulfurique, une tache principale, de Rf légèrement supérieur, qui correspond à la N-diméthyl-β-phénylséryl-valine. On chromatographie sur 6,5g de silice, l'éluat étant recueilli par fractions de 50cm³.

Solvant	Fraction	Poids	CCM
CH ₂ Cl ₂ , CH ₃ OH 5%	1- 8	0,040g	
- - 10%	9-13	0,054g	une tache principale (Dragendorff/ H ₂ SO ₄)
- - 15%	14-17	0,017g	phénylalanine (ninhydrine)
- - 20%	18-21	0,016g	

Les produits élués de la résine carboxylique par l'ammoniaque (0,102g) sont chromatographiés sur 4g de silice. On élue par un mélange de chloroforme contenant 15% de méthanol 0,056g de p-tyramine, purs en CCM, qui sont cristallisés dans l'alcool absolu, F = 162°, spectre I.R. superposable à celui d'un échantillon de référence.

26b N-diméthyl-β-phénylséryl-valinate de méthyle

Les fractions 9-13 (0,054g) obtenues dans la chromatographie des produits d'hydrolyse acide du dérivé, 23a, non retenus par la résine carboxylique, sont dissoutes dans 1cm³ de méthanol et additionnées de 2cm³ de solution étherée de diazométhane. Après 2 h. 30 de contact à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 2g de silice. On élue par du chloroforme contenant 0,5% de méthanol, 0,020g d'ester, purs en CCM, mais qui ne cristallisent pas.

Spectre I.R. (CHCl₃) : H mobiles à 3350cm⁻¹ ; amides à 1700, 1650 et 1510cm⁻¹ ; ester à 1740cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CDCl₃) : 6 protons, 2 doublets (J=6,5Hz) des méthyles du groupe isopropyle à 0,91 et 0,94ppm ; 6 protons, singulet du N(CH₃)₂ à 2,29ppm ; 1 proton, doublet (J=6Hz) de l'hydrogène en α du groupe N(CH₃)₂ à 3,36 ppm ; 3 protons, singulet du groupe COOCH₃ à 3,71ppm ; 1 proton, pic large de l'OH à 4,15ppm ; 1 proton, quadruplet (J=9; J'=4Hz) de l'hydrogène en α du NH de la valine à 4,45ppm ; 1 proton, doublet (J=6Hz) de l'hydrogène en α de l'OH à 5,04ppm ; 6 protons, cycle benzénique et CO-NH entre 7,20 et 7,40ppm

Spectre de masse (sur spectrographe Atlas CH₄) : pas de pic moléculaire ;
pic M-107 à m/e 215.

26c N-diméthyl-O-acétyl-β-phénylséryl-valinate de méthyle

0,020g de N-diméthyl-β-phénylséryl-valinate de méthyle, 26b, sont dissous dans 0,3cm³ de pyridine et additionnés de 0,3cm³ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on dilue par de l'eau, alcalinise à l'ammoniaque et extrait au chloroforme. La solution chloroformique, lavée et séché, est évaporé à sec. On chromatographie le résidu sur 1g de silice. Par un mélange à parties égales de benzène et de chloroforme, on élue, en tête, 0,010g de N-diméthyl-O-acétyl-β-phénylséryl-valinate de méthyle, purs en CCM, qui sont sublimés, F = 115-118°, [α]_D + 28° (CHCl₃).

Analyse : C₁₉H₂₈O₅N₂

calc. %	C 62,62	H 7,74	N 7,69
tr. %	62,51	7,60	7,91

Spectre I.R. (CHCl₃) : CO-NH à 3420, 3370, 1680 et 1510cm⁻¹ ;
ester à 1740cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CDCl₃) : 6 protons, 2 doublets (J=6,5Hz) des méthyles du groupe isopropyle à 0,95 et 1,00ppm ; 3 protons, singulet du O-CO-CH₃ à 2,08ppm ; 6 protons, singulet du N(CH₃)₂ à 2,35ppm ; 1 proton, doublet (J=5,7Hz) de l'hydrogène en α du N(CH₃)₂ à 3,27ppm ; 3 protons, singulet du groupe COOCH₃ à 3,73ppm ; 1 proton, quadruplet (J=9, J'=4Hz) de l'hydrogène en α du NH à 4,53ppm ; 1 proton, doublet (J=5,7Hz) de l'H en α du O-CO-CH₃ à 6,17ppm ; 6 protons, cycle benzénique et CO-NH entre 7,2 et 7,35ppm.

Spectre de masse : (sur spectrographe Atlas CH₄) : pic M⁺ = 364 ; pic à m/e 304 (M-60).

23b N-diméthyl-β-phénylséryl-valyl-phénylalaninyl-O-méthyl-tyramine

0,190g de produit 23a sont dissous dans 3cm³ de méthanol et additionnés de 10cm³ de solution étherée de diazométhane. Après 5 heures de contact à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 7,6g de silice. On élue en tête au chloroforme, 0,129g de produit 23b, purs en CCM, qui sont cristallisés dans l'acétone, F = 167°, [α]_D + 31° (CHCl₃).

Analyse : C₃₄H₄₄O₅N₄

calc. %	C 69,36	H 7,53	O 13,59	N 9,52
tr. %	69,30	7,38	13,77	9,64

Spectre U.V. : épaulement λ 225nm, $\log \epsilon$ 4,60 ; $\lambda_{\max}$ 279nm; $\log \epsilon$ 3,54 ; 286 (3,48).

Spectre I.R. (CHCl_3) : H mobiles à 3420 et 3340 cm^{-1} ; amides à 1660 et 1510 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 doublet ($J=6,5\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle à 0,77 et 0,82ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,26ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,76ppm ; 1 proton, doublet ($J=7\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH à 4,99ppm ; 15 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,6 et 7,5ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 482 ; pics à m/e 424, 347, 332, 304, 184, 157 ; m/e 134 ; m/e 106-105, 91, 77, 58.

23c N-diméthyl-O-acétyl- β -phénylséryl-valyl-phénylalaninyl-O-méthyl-tyramine

0,060g de dérivé 23b sont dissous dans 0,5 cm^3 de pyridine et additionnés de 0,5 cm^3 d'anhydride acétique. On laisse reposer une nuit à la température ambiante, puis dilue à l'eau glacée, alcalinisée par de l'ammoniaque et extrait au chloroforme. La solution chloroformique évaporée à sec fournit 0,061g de produit brut, qui sont cristallisés dans l'acétone/éther, $F = 159^\circ$, $[\alpha]_D + 26^\circ$ (CHCl_3).

Analyse $\text{C}_{36}\text{H}_{46}\text{O}_6\text{N}_4$

calc. %	C 68,55	H 7,35	O 15,22	N 8,88
tr. %	68,81	7,08	15,26	8,90

Spectre U.V. : épaulement λ 225nm, $\log \epsilon$ 4,73 ; $\lambda_{\max}$ 278 ; $\log \epsilon$ 3,56 ; 286 (3,50).

Spectre I.R. (CHCl_3) : CO-NH à 3410, 3330, 1660 et 1510 cm^{-1} ; ester à 1740 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 doublets ($J=6,5\text{Hz}$) des méthyles du groupe isopropyle à 0,76 et 0,92ppm ; 3 protons, singulet du O-CO- CH_3 à 2,03 ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,30ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,78ppm ; 1 proton, doublet de l'hydrogène en α du groupe OCO CH_3 à 6,13ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,6 et 7,4ppm.

Spectre de masse : pic $\text{M}^+ = 630$; pic à m/e 570 (M-60).

Hydrolyse alcaline de la lasiodine A

0,300g de lasiodine A sont dissous dans 4cm³ de soude méthanolique à 2% (environ 0,5N). Après 1 heure de contact à la température ambiante, on dilue à l'eau et extrait à l'acétate d'éthyle. La solution organique, évaporée à sec, fournit 0,270g de produits qui sont chromatographiés sur 11g de silice. On élue au chloroforme contenant 0,5% de méthanol, 0,110g de N-diméthyl-β-phénylséryl-déhydro-valyl-déhydro-phénylalanil-p-hydroxy-styrylamine, 27a, pure en CCM et, au chloroforme contenant 2% de méthanol, 0,028g de N-diméthyl-β-phénylséryl-déhydrovalyl-β-phénylséryl-p-hydroxy-styrylamine, 28a, Rf en CCM et spectres identiques à ceux du produit obtenu par action de LiAlH₄ sur la lasiodine A (voir ci-dessous).

La solution aqueuse alcaline, qui a été extraite par l'acétate d'éthyle, est acidifiée par l'acide chlorhydrique concentré, puis évaporée à sec. Le résidu est repris par un mélange de chloroforme/acool absolu 85/15 (trois fois 20cm³). La solution organique, mise à sec, fournit 0,060g de produit qui sont recristallisés dans le méthanol/acétone. On obtient ainsi 0,020g de chlorhydrate de N-méthyl-L-valine, $[\alpha]_D + 33^\circ$ (HCl 6N), Rf en CCM et spectre de R. M. N. identiques à ceux du produit obtenu dans l'hydrogénation catalytique de la lasiodine A.

27a N-diméthyl-β-phénylséryl-déhydrovalyl-déhydrophénylalanil-p-hydroxy-styrylamine

Le produit pur en CCM, obtenu par chromatographie des produits d'hydrolyse alcaline de la lasiodine A, est cristallisé dans l'acétone, F = 217°, $[\alpha]_D + 123^\circ$ (CHCl₃/CH₃OH 1/1).

Analyse : C₃₃H₃₆O₅N₄

calc %	C 69,70	H 6,38	O 14,07	N 9,82
tr. %	69,69	6,29	14,49	9,75

Spectre U. V. : forte absorption terminale de type aromatique ; plateau de 270 à 295nm, log ε 4,61.

Spectre I. R. (CHCl₃) : H mobiles à 3400 et 3300cm⁻¹ ; amides à 1670, 1650 et 1630cm⁻¹.

Spectre de R. M. N. (CDCl₃) : 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe (CH₃)₂C= à 1,76 et 2,02ppm ; 6 protons, singulet du N(CH₃)₂ à 2,23ppm ; 1 proton, doublet (J=6,5Hz) de l'hydrogène en α du N(CH₃)₂ à 3,16ppm ; 1 proton, doublet (J=6,5Hz) de l'hydrogène en α de l'OH à 4,87ppm ; 1 proton doublet (J=9,5Hz) d'un H vinylique à 5,71ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,6 et 7,4ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 462.

27b N-diméthyl-β-phénylséryl-déhydrovalyl-déhydrophénylalanil-p-méthoxy-styrylamine

0,050g de dérivé 27a sont dissous dans 1cm³ de méthanol et additionnés de 5cm³ de solution étherée de diazométhane. Après 1 h. 30 à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 2g de silice. On élue, en tête, au chloroforme, 0,023g de produit 27b, purs en CCM, mais qui ne cristallisent pas.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; plateau entre 270 et 294nm, $\log \epsilon$ 4,43.

Spectre I.R. (CHCl_3) : H mobiles à 3410 et 3300 cm^{-1} ; amides à 1680 et 1650 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$, à 1,79 et 2,26ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,24ppm ; 1 proton, doublet ($J=6\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,14ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,75ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH à 4,88ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un H vinylique à 5,71ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,7 et 7,5ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 476 ; pics à m/e 415, 328, 294, 182 ; m/e 149, 121 ; m/e 106-105, 91, 77, 58.

27c N-diméthyl-O-acétyl- β -phénylséryl-déhydrovalyl-déhydrophénylanalyl-p-méthoxy-styrylamine

0,020g de dérivé 27b sont dissous dans 0,5 cm^3 de pyridine et additionnés de 0,5 cm^3 d'anhydride acétique. On laisse reposer une nuit à la température ambiante, puis dilue à l'eau, alcalinise par l'ammoniaque et extrait au chloroforme. La solution chloroformique, fou rnit 0,023g de dérivé 27c, purs en CCM.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; plateau entre 270 et 294nm, $\log \epsilon$ 4,55.

Spectre I.R. (CHCl_3) : -CONH- à 3420, 3300, 1680, 1650 cm^{-1} ; ester à 1745 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$ à 1,86 et 2,05ppm ; 3 protons, singulet du O-CO- CH_3 à 1,94ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,24ppm ; 1 proton, doublet ($J=5,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,28ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,79 ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un H vinylique à 5,77ppm ; 1 proton, doublet ($J=5,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du groupe O-CO- CH_3 à 6,11ppm ; 16 protons cycles benzéniques et CONH entre 6,7 et 7,5ppm.

Spectre de masse : pic M^+ = 624 ; pic à m/e 564 (M-60).

28a N-diméthyl- β -phénylséryl-déhydrovalyl- β -phénylséryl-p-hydroxy-styrylamine

A 0,250g de lasiodine A, dissous dans 20 cm^3 de tétrahydrofuranne, on ajoute, sous agitation magnétique, 0,100g de LiAlH_4 . L'agitation est poursuivie pendant une heure, puis l'excès d'hydruure est détruit par addition d'acétate d'éthyle et de quelques gouttes d'eau. Le précipité d'alumine est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé

à sec. Le résidu est dissous dans l'acétate d'éthyle et la solution organique lavée, séchée et mise à sec, fournit 0,210g de produit qui sont chromatographiés sur 8,4g de silice. Par du chlorure de méthylène contenant 2% de méthanol, on élue 0,186g de dérivé 28a, purs en CCM, mais qui ne cristallisent pas.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; $\lambda_{\max}$ 283nm, log ϵ 4,39.

Spectre I.R. (CHCl_3) : H mobiles à 3400 et 3300 cm^{-1} ; amides à 1660 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$ à 1,64 et 1,71ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,20ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) du proton en α du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,20ppm ; 1 proton, doublet ($J=5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH de la phénylsérine à 5,27ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un H vinylique à 5,67ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,4 et 7,6ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à 480 ; pics à m/e 462 (480-18), 374 (M-2 x 106), 328, 281, 298, 182 ; m/e 135 ; m/e 106-105, 91, 77, 58.

28b N-diméthyl- β -phénylséryl-déhydrovalyl- β -phénylséryl-p-méthoxy-styrylamine

0,095g de dérivé 28a sont dissous dans 0,5 cm^3 de méthanol et additionnés de 3 cm^3 de solution étherée de diazométhane ; après une heure de contact à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 4g de silice. On élue par du chloroforme contenant 1% de méthanol, 0,046g de dérivé 28b, pur en CCM.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; $\lambda_{\max}$ 284nm, log ϵ 4,20.

Spectre I.R. (CHCl_3) : H mobiles à 3410 et 3300 cm^{-1} ; amides à 1685 et 1660 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 6 protons, 2 singulets des méthyles du groupe $(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{}$ à 1,66 et 1,73ppm ; 6 protons, singulet du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,20ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α du groupe $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 3,14ppm ; 3 protons, singulet du OCH_3 à 3,76ppm ; 1 proton, doublet ($J=6,5\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH de la N-diméthyl- β -phénylsérine à 4,83ppm (superposé au précédent) ; 1 proton, doublet ($J=4\text{Hz}$) de l'hydrogène en α de l'OH de la β -phénylsérine à 5,38ppm ; 1 proton, doublet ($J=9,5\text{Hz}$) d'un H vinylique à 5,68ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CONH entre 6,5 et 7,5ppm.

Spectre de masse : pas de pic moléculaire ; pic M-106 à m/e 494 ; pics à m/e 476 (494-18) ; m/e 388 (M-2 x 106) ; m/e 327, 182 ; m/e 149 ; m/e 106-105, 91, 77, 58.

28c N-diméthyl-O-acétyl-β-phénylséryl-déhydrovalyl-β-phénylséryl-p-méthoxy-styrylamine

0,046g de dérivé 28b sont dissous dans 0,5cm³ de pyridine et additionnés de 0,5 cm³ d'anhydride acétique. Après une nuit à la température ambiante, on dilue à l'eau, alcalinise par l'ammoniaque et extrait au chloroforme. Le résidu est chromatographié sur 2g de silice. On élue, en tête, au chloroforme, 0,040g de dérivé 28c pur en CCM.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique ; $\lambda_{\max}$ 285nm, log ϵ 4,35.

Spectre I.R. (CHCl₃) : CO-NH à 3410, 3310, 1685 et 1660cm⁻¹ ; ester à 1740cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CDCl₃) : 6 protons, 2 singulets de méthyles du groupe (CH₃)₂C= à 1,77 et 1,81ppm ; 3 protons, singulet d'un O-CO-CH₃ à 1,88ppm ; 3 protons singulet d'un O-CO-CH₃ à 2,04ppm ; 6 protons, singulet du N(CH₃)₂ à 2,30ppm ; 1 proton, doublet (J=5,5Hz) de l'hydrogène en α du N(CH₃)₂ à 3,37ppm ; 3 protons, singulet du OCH₃ à 3,78ppm ; 1 proton, multiplet du proton en α du NH de la β-phénylsérine à 4,84ppm ; 1 proton, doublet (J=9,5Hz) d'un H vinylique à 5,65ppm ; 1 proton, doublet (J=5,5Hz) de l'hydrogène en α d'un groupe O-CO-CH₃ de la N-diméthyl-O-acétyl-β-phénylsérine à 6,08ppm ; 1 proton, doublet (J=6Hz) de l'hydrogène en α du groupe O-CO-CH₃ de la O-acétyl-β-phénylsérine à 6,26ppm ; 16 protons, cycles benzéniques et CO-NH entre 6,5 et 7,4ppm.

Spectre de masse : pic M⁺ à m/e 684 ; pic à m/e 624 (M-60) et 564 (M-2 x 60).

Hydrolyse acide de la N-diméthyl-β-phénylséryl-déhydrovalyl-β-phénylséryl-p-hydroxy-styrylamine, 28a : 29 D-thréo-β-phénylsérine

A 0,269g de dérivé 28a dissous dans 7cm³ d'acide acétique, on ajoute 7cm³ d'eau et 14cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On porte à ébullition à reflux, pendant une heure, puis on filtre pour éliminer des produits moins solubles. Le filtrat est évaporé à sec et le résidu est dissous dans environ 10cm³ d'alcool absolu et mis à sec de nouveau. On répète les deux dernières opérations plusieurs fois jusqu'à élimination de l'excès d'acide chlorhydrique. Finalement, on reprend le résidu par 15cm³ d'eau. La solution obtenue est passée sur une colonne de 30cm³ d'amberlite IR 120 en phase acide, puis la résine est lavée avec 200cm³ d'eau. Les produits fixés sont élués par 600cm³ d'ammoniaque à 3%. La solution alcaline est évaporée à sec. Le résidu (0,110g), analysé en CCM, présente, après révélation par la ninhydrine, une tache de même R_f que la thréo-β-phénylsérine et, après révélation par le réactif de Dragendorff sulfurique, une seconde tache de R_f supérieur à celui des acides aminés.

Ce résidu est chromatographié sur silice ; on élue par un mélange à parties égales de chloroforme et de méthanol 0,018g de D-thréo-β-phénylsérine, purs en CCM, qui sont cristallisés dans l'alcool absolu, $[\alpha]_D + 31^\circ$, spectre I.R. superposable à celui de la D (ou L)-thréo-β-phénylsérine (24).

30 N-diméthyl-β-phénylsérinamide

Le résidu obtenu par hydrolyse acide de 28a et chromatographié sur silice (voir ci-dessus) fournit par élution au mélange chloroforme/méthanol (95/5) 0,016g de N-diméthyl-β-phénylsérinamide, monotache en CCM et purifié par sublimation, $F = 105^\circ$, $[\alpha]_D + 26^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{N}_2$

calc. %	C 63,44	H 7,74	O 15,37	N 13,45
tr. %	63,59	7,59	15,61	13,17

Spectre I.R. (CHCl_3) : CONH_2 à 3500, 3370, 1675 et 1540cm^{-1} ; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2880, 2840 et 2795cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,28 ; $-\underline{\text{CH}}-\text{N}$, $\underline{d}$ ($J=6,5\text{Hz}$) à 3,29 ; OH, pic large à 4,01 ; $\underline{\text{CH}}-\text{OH}$, $\underline{d}$ ($J=6,5\text{Hz}$) à 5,06 ; CONH_2 , pic large à 6,00 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,38.

Spectre de masse : pic $\text{M}^+ = 208$; pics à m/e 190 (M-18), 164, 106-105, 91, 77, 58.

31 DL-thréo- et DL-erythro-β-phénylsérines

A une solution contenant 30g de glycolle et 24g de soude dans 100cm^3 d'eau, on ajoute en une fois et sous agitation 84,9g de benzaldéhyde redistillé en refroidissant à 15° . Après 1 heure d'agitation, 50cm^3 d'HCl concentré sont ajoutés au milieu maintenu à 15° pendant encore une heure.

Le milieu réactionnel est ensuite refroidi à 5° et agité pendant 2 heures, puis filtré et le précipité est lavé avec 3 fois 250cm^3 d'éthanol à 95° bouillant.

Le résidu de β-phénylsérine brute obtenu est séché (33,4g), puis cristallisé dans l'eau fournissant ainsi 11g de DL-thréo-β-phénylsérine à peu près pure. Le filtrat est alors chauffé à ébullition et additionné d'un égal volume de dioxanne bouillant, ce qui fournit 17g d'un produit d'addition DL-erythro-β-phénylsérine-dioxanne qui précipite. A ce stade, le filtrat est concentré, porté à ébullition et additionné d'un égal volume d'éthanol bouillant, 6g de DL-thréo-β-phénylsérine pure sont ainsi obtenus.

Les 17g de DL-thréo sont recristallisés dans un mélange eau/ éthanol à parties égales, fournissant 11g de produit anhydre et pur. Les 17g de produit d'addition DL-erythro - dioxanne sont dissous dans l'eau bouillante, la solution obtenue refroidie et concentrée donne 7g de DL-erythro-β-phénylsérine pure cristallisées sous forme d'hémi-hydrate.

Les spectres I.R. des deux diastéréoisomères sont analogues à ceux publiés (24).

Spectres de R.M.N. (D_2O) : - DL-erythro : $\underline{CH-NH_2}$, $\underline{d}$ ($J=4$) à 4,12 ; $\underline{CH-OH}$, $\underline{d}$ ($J=4$) à 5,38 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,44 ;

- DL-thréo : $\underline{CH-NH_2}$, $\underline{d}$ ($J=4,5$) à 3,97 ; $\underline{CH-OH}$, $\underline{d}$ ($J=4,5$) à 5,35 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,50.

32 N-benzyloxycarbonyl- β -phénylsérine

A 1,800g de β -phénylsérine (DL-thréo ou DL-erythro) et 2,100g de bicarbonate de sodium, en suspension dans $15cm^3$ d'eau, on ajoute sous agitation magnétique et à température ordinaire $1,6cm^3$ de chlorure de benzyloxycarbonyle par fractions de $0,20cm^3$ toutes les 15 minutes. Après 2 heures de réaction, la solution aqueuse obtenue est lavée à l'éther, puis acidifiée et extraite par l'acétate d'éthyle. La phase organique évaporée à sec fournit 2,700g de produit pur en CCM.

Spectre I.R. ($CHCl_3$) : CONH à 3440, 1720, $1510cm^{-1}$.

Spectre de R.M.N. ($CDCl_3$) : CH_2O , $\underline{s}$ à 4,98 ; OH, pic large à 5,55 ; 2 C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,25.

Spectre de masse : pic M^+ = 315, pics à m/e 297 (M-18), 270, 209 (M-106), 106-105, 91, 77.

33 Ester méthylique de la N-benzyloxycarbonyl- β -phénylsérine

2,200g de produit 32 sont dissous dans $3cm^3$ de méthanol et additionnés de $25cm^3$ de solution étherée de diazométhane. Après 1 heure de contact à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu est chromatographié sur 92g de silice, on élue en tête au chloroforme 1,990g de produit pur en CCM qui cristallise dans l'éther, $F = 87^\circ$, $[\alpha]_D = -58^\circ$ ($CHCl_3$) (D-erythro).

Analyse : $C_{18}H_{19}O_5N$

calc. %	C 65,64	H 5,82	O 24,29	N 4,25
tr. %	65,64	6,01	24,23	4,19

Spectre I.R. ($CHCl_3$) : CONH à 3420, 1720 et $1510cm^{-1}$; C=O ester à $1720cm^{-1}$.

Spectre de R.M.N. ($CDCl_3$) : $COOCH_3$, $\underline{s}$ à 3,63 ; $\underline{CH-NH}$, $\underline{2d}$ ($J=4,5$, $J'=8$) à 4,71 ; CH_2O , $\underline{s}$ à 5,08 ; $\underline{CH-OH}$, $\underline{d}$ ($J=4,5$) à 5,18 ; NH, $\underline{d}$ ($J=8$) à 5,53 ; 2 C_6H_5 , $\underline{2s}$ à 7,28 et 7,32 (D-erythro).

Spectre de masse : pic M^+ = 329, pics à m/e 311 (M-18), 298 (M-31), 279, 270, 252, 223 (M-106), 178, 162, 106-105, 91, 77.

34 N-benzyloxycarbonyl- β -phénylsérinamide

A 1,200g d'ester 33, on ajoute 20cm³ d'une solution d'ammoniac dans le méthanol et on laisse en contact à la température ambiante. Après 15 heures de réaction, la solution est évaporée à sec, puis reprise par le méthanol et évaporée de nouveau (3 fois) pour éliminer NH₃ en excès. Le résidu obtenu (1,140g) pur en CCM est cristallisé dans l'acétone, F = 174°, $[\alpha]_D = -24^\circ$ (CHCl₃-CH₃OH 1/1) (D-erythro).

Analyse : C₁₇H₁₈O₄N₂

calc. %	C 64,95	H 5,77	O 20,36	N 8,91
tr. %	64,68	5,75	20,49	8,92

Spectre I.R. (nujol) : bandes amides à 3390, 3330, 1695, 1665, 1540cm⁻¹ ; H mobiles à 3220cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CDCl₃ + CD₄O) : CH₂O, $\underline{s}$ à 4,98 ; C₆H₅, $\underline{s}$ à 7,25 ; C₆H₅, $\underline{s}$ à 7,32 (D-erythro).

Spectre de masse : pic M⁺ = 314, pics à m/e 296 (M-18), 270 (M-44), 208 (M-106), 164, 106-105, 91, 77.

35 N-diméthyl- β -phénylserinamide

0,800g de produit 34, dissous dans 50cm³ de méthanol sont additionnés de 1,20cm³ de solution de formol à 30% et de 2cm³ de solution d'acide acétique à 10% dans le méthanol en présence de 0,800g de charbon palladié à 10%, et hydrogénés 15 heures à la température ambiante et à la pression atmosphérique. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée. La solution est filtrée et évaporée à sec, l'excès de formol est éliminé par évaporation répétée de petites quantités d'eau ajoutées au résidu. Le produit brut obtenu (0,680g) sous forme d'acétate est dissous dans 20cm³ de méthanol et passé sur 20cm³ de résine amberlite IRA 410, préalablement lavée (400cm³ de NaOH N, H₂O à neutralité puis CH₃OH). On élue par le méthanol 0,610g de produit sous forme de base qui est alors chromatographiée sur 25g de silice. Par élution au mélange chloroforme/méthanol (99/1), on obtient 0,450g de produit mono-tache en CCM, purifié par sublimation, F = 106°, $[\alpha]_D = -28^\circ$ (CHCl₃) (D-erythro).

Analyse : C₁₁H₁₆O₂N₂

calc. %	C 63,44	H 7,74	O 15,37	N 13,45
tr. %	63,50	7,69	15,42	13,29

Spectre I.R. (CHCl₃) : les spectres du DL-erythro, du D et du L-erythro sont identiques à celui du produit naturel 30.

- DL-thréo : CONH₂ à 3525, 3410, 1685 et 1595cm⁻¹ ; N(CH₃)₂ à 2880, 2845 et 2800cm⁻¹.

Spectres de R.M.N. (CDCl_3) :

- D-erythro : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,27 ; CH-N , $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 3,24 ; $\underline{\text{CHOH}}$, $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 5,03 ; CONH_2 , pic large à 6,00 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.
- DL-erythro : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,32 ; CH-N , $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 3,16 ; OH , pic large à 3,80 ; $\underline{\text{CHOH}}$, $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 5,04 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.
- DL-thréo : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,50 ; OH , pic large à 2,91 ; CH-N , $\underline{d}$ ($J=9,8$) à 3,05 ; $\underline{\text{CHOH}}$, $\underline{d}$ ($J=9,8$) à 4,93 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,43.

Spectre de masse : spectres identiques à celui du produit naturel 30.

36 N-trifluoroacétyl-DL-erythro- β -phénylsérine

. Chlorhydrate de DL-erythro- β -phénylsérine éthyl ester

50g de DL-erythro- β -phénylsérine sont mis en suspension dans 500cm^3 d'éthanol absolu et le mélange est saturé par un courant d' HCl gazeux et sec. Le produit passe alors en solution et le chlorhydrate de l'ester éthylique de la DL-erythro- β -phénylsérine cristallise (38g), $F = 186^\circ$ (théorie : 182°).

Spectre I.R. (nujol) : H mobiles à 3320 et 3130cm^{-1} ; C=O ester à 1750cm^{-1} .

. Ester éthylique de la DL-erythro- β -phénylsérine

34g du produit précédent sont dissous dans la quantité d'eau minimum, la solution est agitée et du carbonate neutre de potassium est ajouté. La phase aqueuse obtenue est alors agitée vigoureusement et plusieurs fois en présence d'acétate d'éthyle dans lequel l'ester libéré passe. La phase organique évaporée à sec fournit 28g d'ester pur en CCM.

Spectre I.R. (nujol) : H mobiles à 3540 et 3490cm^{-1} ; C=O ester à 1730cm^{-1} .

. Ester éthylique de la N-trifluoroacétyl-DL-erythro- β -phénylsérine

28g de l'ester précédent sont mis en suspension dans 150cm^3 d'éther anhydre et on ajoute, goutte à goutte, sous agitation 15g d'anhydride trifluoroacétique. Après 1 heure de réaction, la solution éthérée est lavée successivement par HCl dilué et froid, puis par une solution saturée de bicarbonate de sodium. La phase organique évaporée à sec fournit 22g de produit pur en CCM, $F = 95^\circ$ (théorie $94-96^\circ$).

Spectre I.R. (nujol) : CONH à 3430 , 1715 et 1540cm^{-1} ; C=O ester à 1745cm^{-1} .

. N-trifluoroacétyl-DL-erythro- β -phénylsérine

A 22g du produit précédent, dissous dans 220cm^3 d'éthanol à 95° , on ajoute sous agitation 110cm^3 de solution aqueuse de soude à 2,6% par fractions de 5cm^3 , toutes les 15 minutes. Après 3 heures de réaction, le milieu est dilué à l'eau et extrait

à l'éther, puis les phases aqueuses rassemblées sont acidifiées par HCl concentré et extraites par l'acétate d'éthyle. La phase organique évaporée à sec fournit 15,6g de produit brut dissous dans la quantité minimum d'acétate d'éthyle et cristallisé par addition d'éther de pétrole (11,7g), $F = 151^\circ$ (théorie $148-150^\circ$).

Spectre I.R. (nujol) : H mobiles à 3280 cm^{-1} ; CONH à $3390, 3090, 1700$ et 1550 cm^{-1} .

Hydrolyse sélective de 36 par la carboxypeptidase

11,6g de 36 sont dissous dans 750 cm^3 d'eau par addition de 100 cm^3 de LiOH 2N (pH 8), la solution obtenue est alors portée à 37° et additionnée de 100mg d'une suspension cristalline de carboxypeptidase. Après 21 heures de contact à 37° , la solution est amenée à pH 6 par addition d'acide acétique, filtrée, et concentrée sous pression réduite à 20° , jusqu'à début de cristallisation. On ajoute alors de l'éthanol, le précipité obtenu, filtré et purifié par cristallisation dans l'eau en présence de charbon activé, fournit 2,730g de L-erythro- β -phénylsérine.

Le filtrat résultant de l'isolement de l'isomère L est dilué par de l'eau, acidifié à pH 2,5 par addition d'HCl concentré et extrait par de l'acétate d'éthyle. La phase organique, évaporée à sec, donne 4,5g de N-trifluoroacétyl-D-erythro- β -phénylsérine brute qui est cristallisée dans un mélange acétate d'éthyle/hexane, $F = 141^\circ$, $[\alpha]_D = -36,5^\circ$ (H_2O) ; spectre I.R. identique à celui de 36.

D-erythro- β -phénylsérine

2,300g de N-trifluoroacétyl-D-erythro- β -phénylsérine sont dissous dans 23 cm^3 d'une solution d'acide acétique à 20%, et la solution obtenue est portée à ébullition à reflux. Après 4 heures d'hydrolyse, la solution est concentrée sous pression réduite et additionnée d'éthanol et d'un peu d'éther. La D-erythro- β -phénylsérine cristallise (0,720g), $[\alpha]_D = -59^\circ$ (CH_3COOH) ; spectre I.R. (KBr) superposable à celui du produit décrit (24).

38 Adouétine X

Un échantillon cristallisé pour analyse dans le dioxanne présente les constantes suivantes : $F = 277-279^\circ$; $[\alpha]_D = -316^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_4\text{N}_4$

calc. %	C 67,17	H 8,86	O 12,78	N 11,19
tr. %	67,19	8,98	13,02	11,29

Spectre U.V. : forte absorption terminale à 250 nm , $\log \epsilon 3,78$.

Spectre I.R. (nujol) : H mobile à 3260 cm^{-1} ; R-CO-N- à $1630, 1510$ et 1680 cm^{-1} ; -C-O-C- à 1240 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CF_3COOH) : 6 CH_3 aliphatiques entre 0,7 et 1,1 ; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{d}$ (J=5) à 3,21 ; 4 protons aromatiques de 6,9 à 7,5.

Spectre de masse : pic M^+ = 500.

Hydrolyse acide des alcalofdes ou des dihydroalcalofdes

10mg d'alcalofdes ou de dihydroalcalofdes sont dissous dans 1cm^3 d'un mélange d'acide acétique, d'acide chlorhydrique et d'eau (1/2/1/) et chauffés à reflux pendant 16 heures. On évapore à sec. Le résidu est repris par de l'éthanol et analysé sur plaque de cellulose (32, 33), dans un système de solvants de migration qui peut être soit méthyl-éthyl-cétone/pyridine/acide acétique/eau (70/15/2/15), soit méthanol/eau/pyridine (80/20/4). La révélation est faite par pulvérisation de ninhydrine (solution à 0,2% dans l'éthanol).

Hydrogénation catalytique des alcalofdes

0,150g d'alcalofde sont dissous dans 10cm^3 d'éthanol absolu ; on réduit sous atmosphère d'hydrogène en présence de 0,030g de charbon palladié à 10%, pendant 1 heure à la pression atmosphérique et à la température ambiante. Après filtration et évaporation à sec, le produit obtenu est cristallisé dans un solvant organique approprié.

Dihydro-adouétine X

Le produit obtenu, pur en CCM, n'a pas cristallisé dans les solvants organiques usuels, $F = 308^\circ$ (déc.).

Spectre I.R. (nujol) : H mobile à 3260cm^{-1} ; CONH à 1635, 1540 et 1510cm^{-1} ; -C-O-C- à 1240cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CF_3COOH) : 6 CH_3 aliphatiques entre 0,8 et 1,3 ; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{d}$ (J=5) à 3,18 ; 4 protons aromatiques de 6,5 à 7,2.

Spectre de masse : pic M^+ = 502.

Hydrolyse acide de la dihydro-adouétine X

10mg de dihydro-adouétine X sont dissous dans 15cm^3 d'un mélange HCl concentré/éthanol absolu à parties égales et hydrolysés en tube scellé à 120° pendant 22 heures. On évapore à sec et le résidu est traité selon la technique habituelle.

Caractérisation de la p-tyramine dans les hydrolysats des dihydroalcaloïdes

Les 10mg d'hydrolysate sont dissous dans 1cm³ d'eau, et 0,1cm³ de cette solution sont déposés sur un papier filtre. On pulvérise alors sur le papier une solution d'acide p-sulfanilique diazoté (0,50g d'acide dans 25cm³ de solution de carbonate de sodium à 10%), puis laisse sécher 10 minutes. Après découpage de la zone de papier révélée, ce dernier est plongé pendant 10 minutes dans 5cm³ de méthanol, et la solution obtenue est analysée directement en UV dans des cuves de 1cm.

39 Adouétine Y

Obtenu cristallisé dans le méthanol, $F = 292^\circ$, $[\alpha]_D = -230^\circ$ (CHCl₃/CH₃OH 9/1).

Analyse : C₃₄H₄₀O₄N₄

calc. %	C 71,80	H 7,09	O 11,25	N 9,85
tr. %	71,62	7,25	11,33	10,05

Spectre U.V. : forte absorption terminale à 250nm, log ϵ 3,83.

Spectre I.R. (nujol) : CONH à 3280, 3250, 1680, 1635 et 1530cm⁻¹ ; -C-O-C- à 1240cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CF₃COOH) : CH₃ aliphatiques entre 0,7 et 1,1 ; N(CH₃)₂, 2d (J=5) à 2,40 et 2,82 ; protons aromatiques entre 7 et 7,7.

Spectre de masse : pic M⁺ = 568.

40 Myrianthine A

Le produit pur en CCM obtenu par chromatographie des alcaloïdes bruts est cristallisé dans le méthanol/chlorure de méthylène, $F 286^\circ$ (déc.); $[\alpha]_D = -263^\circ$ (CHCl₃).

Analyse : C₃₁H₄₂O₄N₄

calc. %	C 69,63	H 7,92	O 11,97	N 10,48
tr. %	69,60	7,83	12,25	10,33

Spectre I.R. : -CONH- à 3280, 1640 et 1510cm⁻¹ ; C-O-C à 1240cm⁻¹.

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique à 250nm, log ϵ 3,79.

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : 4 CH_3 aliphatiques entre 0,6 et 1,0 ; $\underline{s}$ de $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 1,76 ; 9 protons benzéniques entre 6,9 et 7,6.

Spectre de masse : $\text{M}^+ = 534$.

Dihydro-myrianthine A

Le produit obtenu, pur en CCM, n'a pas cristallisé dans les solvants organiques usuels, $F = 291^\circ$ (déc.).

Spectre I.R. (nujol) : CONH à 3280, 1640 et 1510cm^{-1} ; -C-O-C- à 1240cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) : 4 CH_3 aliphatiques entre 0,6 et 1,0 ; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{s}$ à 1,85 ; $\underline{\text{CH}}\text{-NH}$, $\underline{d}$ ($J=8,5$) à 4,75 ; $\underline{\text{CH}}\text{-O}\varphi$, $\underline{d}$ ($J=8,5$) à 5,85 ; 9 protons aromatiques entre 6,9 et 7,6.

Spectre de masse : pic $\text{M}^+ = 536$.

41 Myrianthine B

Les fractions 5-6, issues de la chromatographie des alcaloïdes bruts, sont cristallisées dans le méthanol/chlorure de méthylène, $F = 302^\circ$ (déc.) ; $[\alpha]_D = -294^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_4$

calc. %	C 69,63	H 7,92	N 10,48
tr. %	69,39	7,64	10,52

Spectre I.R. : -CONH- à 3260, 1680, 1635 et 1510cm^{-1} ; C-O-C à 1240cm^{-1} .

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique à 250nm, $\log \epsilon$ 3,73.

Spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) : 4 CH_3 aliphatiques entre 0,4 et 1,3, dont 3 protons $\underline{d}$ ($J=6,7$) du méthyle secondaire de l'isoleucine à 0,51 et 6 protons, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) correspondant au groupe isopropyle de la β -hydroxyleucine à 0,99 et 1,23 ; $\underline{s}$ du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,26 ; 9 protons aromatiques entre 7 et 7,3.

Spectre de masse : pic $\text{M}^+ = 534$.

42 Myrianthine C

Les fractions 10 à 16 de la chromatographie des alcaloïdes bruts sont cristallisées dans le méthanol/chlorure de méthylène, $F = 294^\circ$ (déc.) ; $[\alpha]_D = -288^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_4\text{N}_4$

calc. %	C 66,67	H 8,64	O 13,17	N 11,52
tr. %	66,86	8,71	13,34	11,42

Spectre I.R. : -CONH- à 3250, 1680, 1670, 1630 et 1510cm^{-1} ; C-O-C à 1240cm^{-1} .

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique à 250nm, $\log \epsilon$ 3,88.

Spectre de R.M.N. ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_4\text{O}$) : 6 CH_3 aliphatiques entre 0,6 et 1,4 dont 6 protons $\underline{d}$ ($J=7$) du groupe isopropyle de la N-diméthylleucine à 0,72 et 3 protons, $\underline{d}$ ($J=6,5$) d'un des méthyles du groupe isopropyle de la β -hydroxy-leucine à 1,24 ; $\underline{s}$ du $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,22 ; 4 protons aromatiques entre 6,9 et 7,1.

Spectre de masse : $M^+ = 486$.

45 Adouétine Z

Le produit pur en CCM, obtenu par chromatographie, est cristallisé dans le cyclohexane, $F = 140-145^\circ$; $[\alpha]_D = -184^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{42}\text{H}_{45}\text{O}_5\text{N}_5$

calc. %	C 72,08	H 6,48	O 11,43	N 10,01
tr. %	71,95	6,72	11,31	9,85

Spectre I.R. (CCl_4) : CONH à 3360, 1700, 1652, 1624 et 1506cm^{-1} ; -C-O-C- à 1230cm^{-1} .

Spectre U.V. : forte absorption terminale à 250nm, $\log \epsilon$ 3,94.

Spectre de R.M.N. (CCl_4) : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{2s}$ à 1,93 et 2,34 ; protons aromatiques entre 6,2 et 7,5.

(CF_3COOH) : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ protoné, $\underline{2d}$ ($J=5$) à 2,95 et 3,27.

Spectre de masse : pic $M^+ = 699$.

Dihydro-adouétine Z

Le produit obtenu est cristallisé dans un mélange acétone/hexane, $F = 221^\circ$;
 $[\alpha]_D = -87^\circ$ (CHCl_3).

Analyse : $\text{C}_{42}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_5$

calc. %	C 70,73	H 6,74	O 12,13	N 9,68
tr. %	70,47	6,79	12,08	9,43

Spectre I.R. (nujol) : CONH à 3400, 1670, 1510 cm^{-1} ; -C-O-C- à 1240 cm^{-1} .

Spectre U.V. : λ_{max} 227nm, log ϵ 4,20 ; 265nm (3,08).

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\underline{2s}$ à 2,16 et 2,36.

Spectre de masse : pic $\text{M}^+ = 701$.

46

Lasiiodine B

Le produit, pur en CCM, provenant de la chromatographie des alcaloïdes bruts, est cristallisé dans l'acétone, $F = 221^\circ$; $[\alpha]_D = -301^\circ$ ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1/1).

Analyse : $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{O}_5\text{N}_5, 1/2 \text{H}_2\text{O}$

calc. %	C 67,04	H 7,72	O 14,03	N 11,16
tr. %	67,30	7,69	13,72	11,05

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique à 250nm, log ϵ 3,90.

Spectre I.R. (nujol) : CO-NH à 3260, 1665, 1630 et 1505 cm^{-1} ; C-O-C à 1240 cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3 + traces de CD_4O) : 4 CH_3 aliphatiques entre 0,6 et 1,4 ;
 $\underline{s}$ de $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ à 2,29 ; 13 protons benzéniques et CO-NH entre 6,5 et 7,6.

Spectre de masse : $\text{M}^+ = 617$.

47 N-acétyl-lasiodine B

1,800g de lasiodine B sont dissous dans 50cm³ de méthanol et additionnés de 8cm³ d'anhydride acétique (69). Après 1 heure de réaction à la température ambiante, le milieu est dilué par de l'eau, alcalinisé par de l'ammoniaque et extrait par le chloroforme. La phase organique, évaporée à sec, fournit 2,015g de produit pur en CCM et qui est cristallisé dans l'éthanol absolu, F = 284° (déc.) ; $[\alpha]_D = -320^\circ$ (CHCl₃).

Analyse : C₃₇H₄₉O₆N₅

calc. %	C 67,35	H 7,49	O 14,55	N 10,62
tr. %	67,19	7,53	14,42	10,78

Spectre U.V. : forte absorption terminale de type aromatique à 250nm, log ε 3,95.

Spectre I.R. (nujol) : bandes amides à 3280, 1640 et 1510cm⁻¹ ; C-O-C à 1240cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (CDCl₃) : 2 CH₃ (β-hydroxy-leucine), 2d (J=6) à 0,77 et 0,89 ; 2 CH₃ (leucine), d (J=6) à 1,25 ; NCOCH₃, s à 1,97 ; NAcCH₃, s à 3,00 ; CH-NH (β-hydroxy-leucine), d dédoublé (J=7 ; J'=9,5) à 4,47 ; CH-Op, d dédoublé (J=7 ; J'=2) à 4,97 ; 2 CO-CH-(NR₂)-CH₂-, t (J=7,5) à 5,73 ; entre 6,29 et 6,70, système A₂B₂ (J_{AB}=7) du noyau benzénique para-disubstitué ; entre 7 et 7,4, 5 protons aromatiques et CONH.

Spectre de masse : pic M⁺ = 659 , pics à m/e 631 (M-28), 616 (M-43), 525 (M-134), 204, 176, 134, 91, 70.

48 Traitement de 47 par OsO₄ puis Pb(OAc)₄

A 1,520g de 47, dissous dans 30cm³ de pyridine, on ajoute 0,650g de tétraoxyde d'osmium dissous dans 1cm³ de pyridine, puis le milieu réactionnel est laissé à l'obscurité (avec agitation magnétique) pendant 24 heures. La solution est alors évaporée à sec et le résidu repris par 30cm³ de dioxanne. Dans la solution obtenue, on fait passer un courant de H₂S pendant 30 minutes et on filtre ensuite. Le filtrat évaporé à sec fournit 1,330g de produit brut présentant 2 taches en CCM (dihydroxy + dioxo).

Ces 1,330g de produit sont dissous dans 35cm³ de chloroforme (distillé sur CaCl₂), additionnés de 1,330g de Pb(OAc)₄ et de 20cm³ de solution chloroformique d'acide acétique à 10%. Après 4 heures de réaction, le milieu est dilué par du chloroforme et la phase chloroformique lavée par de l'ammoniaque diluée. La solution organique évaporée à sec fournit 1,210g de produit brut qui sont chromatographiés sur 49g de silice, on élue au mélange chlorure de méthylène/méthanol (99/1) 0,790g de produit pur en CCM qui ne cristallise pas dans les solvants organiques usuels.

Spectre I.R. (nujol) : CONH à 3295 , 1650 , 1600 et 1505cm^{-1} ; C-O-C à 1245cm^{-1} ; C=O aldéhyde à 1695cm^{-1} ; C=O imide à 1750cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : CH_3 aliphatiques, $\underline{2d}$ ($J=6$) à $0,93$ et $1,03$; NCOCH_3 , $\underline{s}$ à $1,94$; NAcCH_3 , $\underline{s}$ à $2,92$; 2H sur noyau benzénique para-disubstitué, $\underline{d}$ ($J=8,5$) à $7,03$; 5 protons aromatiques à $7,25$; 2H sur noyau benzénique para-disubstitué, $\underline{d}$ ($J=8,5$) à $7,77$; CHO imide, $\underline{d}$ ($J=9$) à $8,97$; NH imide, $\underline{d}$ ($J=9$) à $9,57$; CHO aldéhyde, $\underline{s}$ à $9,80$.

Spectre de masse : pic M^+ = 691 , pics à m/e 673 (M-18), 663 (M-28), 646 (M-45), 619 (M-72), 600 (M-91), 558 , 524 , 442 , 338 , 301 , 278 , 204 , 176 , 134 , 122 - 121 , 98 , 97 , 91 , 86 , 70 .

49 Hydrogénation catalytique de 48

$0,79\text{g}$ de 48 sont dissous dans 30cm^3 d'éthanol absolu ; on réduit sous atmosphère d'hydrogène en présence de $0,300\text{g}$ de charbon palladié à 10% , pendant 20 heures à la pression atmosphérique et à la température ambiante. Après filtration et évaporation à sec, le produit obtenu est chromatographié sur 30g de silice. Par élution au mélange chlorure de méthylène/méthanol ($99/1$), on obtient $0,380\text{g}$ de produit pur en CCM ne cristallisant pas dans les solvants organiques usuels.

Spectre I.R. (CHCl_3) : CONH à 3420 , 3320 , 1680 , 1640 et 1510cm^{-1} ; C-O-C à 1230cm^{-1} ; C=O imide à 1750 et 1700cm^{-1} .

Spectre de R.M.N. (CDCl_3) : CH_3 aliphatiques, $\underline{2d}$ ($J=6$) à $0,93$ et $1,08$; NCOCH_3 , $\underline{s}$ à $1,83$; ArCH_3 , $\underline{s}$ à $2,27$; NAcCH_3 , $\underline{s}$ à $2,78$; protons aromatiques entre $6,7$ et $7,4$; CHO imide, $\underline{d}$ ($J=9,5$) à $8,80$; NH imide, $\underline{d}$ ($J=9,5$) à $9,22$.

Spectre de masse : pic M^+ = 677 , pics à m/e 662 (M-15), 649 (M-28), 633 (M-44), 606 (M-71), 571 (M-106), 526 , 412 , 339 , 301 , 278 , 204 , 176 , 134 , 108 - 107 , 97 , 91 , 86 , 77 , 70 .

Hydrolyse acide de 49 et chromatographie sur résine échangeuse d'ions de l'hydrolysate

$0,330\text{g}$ de 49 sont dissous dans 33cm^3 d'un mélange acide acétique/acide chlorhydrique/eau ($1/2/1$) et chauffés à reflux pendant 32 heures. On évapore à sec. Le résidu est repris par de l'éthanol et analysé en CCM de silice ; il est ensuite dissous dans 20cm^3 d'HCl $0,24\text{N}$, pour être chromatographié sur 60cm^3 de résine sulfonique en phase H^+ (Dowex 50W - X12, 200 - 400mesh) préalablement lavée (800cm^3 HCl 2N , 300cm^3 H_2O , 600cm^3 NaOH 2N , 3l. H_2O , 1500cm^3 HCl 2N et 3l. HCl $0,24\text{N}$). Par élution avec HCl N , on obtient la proline, puis la leucine, et avec HCl

2N la N-méthyl-phénylalanine, tous trois sous forme de chlorhydrate.

Par passage sur une résine sulfonique en phase acide (amberlite IR 120) et élution par l'ammoniaque à 3%, chaque acide aminé est obtenu pur sous forme de base. Le Rf en CCM, le pouvoir rotatoire et le spectre I.R. (nujol) de ces trois acides aminés sont identiques à ceux d'échantillons de référence de L-proline, L-leucine et N-méthyl-L-phénylalanine (23).

50 β -(p-tolyloxy)-leucine

Le produit 50 est obtenu pur par élution de la colonne avec HCl 6N, puis passé sur 2cm³ de résine amberlite IR 120 en phase acide. Par élution avec de l'ammoniaque à 3%, on obtient 0,035g de β -(p-tolyloxy)-leucine, sous forme de base, pure en CCM.

Spectre I.R. (nujol) : C=O acide à 1620cm⁻¹ ; C-O-C à 1220cm⁻¹.

Spectre de R.M.N. (D₂O) : (CH₃)₂CH, d (J=6,5) à 1,06 ; ArCH₃, s à 2,30 ; CH-NH, d (J=3) à 4,38 ; CH-O ϕ , d dédoublé (J=3, J'=8,5) à 4,63 ; entre 6,97 et 7,37, système A₂B₂ (J_{AB}=9) du noyau benzénique para-disubstitué.

Spectre de masse : pic M⁺ = 237, pics à m/e 192 (M-45), 163, 121, 108-107, 91, 74, 55.

51 Synthèse des DL-thréo et DL-erythro- β -hydroxy-leucines (49)

A une suspension de 23g de complexe glycinate de cuivre (70) dans une solution de potasse à 20%, on ajoute 30g d'isobutyraldéhyde fraîchement distillé. La suspension est agitée quelques minutes, puis on laisse reposer à + 4° toute la nuit. Le mélange est alors agité mécaniquement à température ambiante pendant 5 heures. On ajoute ensuite 200cm³ d'eau et 170cm³ d'ammoniaque, la solution obtenue est filtrée et le filtrat est passé sur 220cm³ de résine amberlite IR 120 en phase ammonium. Le produit est élué de la colonne avec une solution d'ammoniaque à 10% et les fractions recueillies sont rassemblées et concentrées sous pression réduite jusqu'à début de cristallisation. On ajoute alors 3 volumes d'éthanol et après cristallisation pendant une nuit à + 4°, les cristaux sont séparés par filtration, lavés par de l'éthanol et séchés sous pression réduite.

Ces cristaux (22g), analysés en CCM, correspondent à un mélange de DL-thréo (60%) et DL-erythro (40%) et l'on sépare les deux diastéréoisomères par la différence de solubilité des sels de sodium.

14,70g de mélange brut sont ajoutés à une solution chaude d'éthylate de sodium, préparée à partir de 2,3g de sodium et 50cm³ d'éthanol absolu. La suspension est chauffée à reflux pendant 1 heure, avec agitation, puis on laisse reposer une nuit à la température ambiante. On filtre et le sel de sodium du DL-thréo, insoluble dans

l'éthanol, est séparé : il est additionné de 50cm³ d'éthanol et chauffé à reflux pendant 1 heure. Le précipité en suspension est filtré, lavé avec de l'éthanol et dissous dans 200cm³ d'eau. La solution est passée sur 60cm³ de résine amberlite IRC 50 en phase H⁺ et éluée par de l'eau, les fractions recueillies sont rassemblées et concentrées sous pression réduite. Par addition d'éthanol, la DL-thréo-β-hydroxy-leucine cristallise (10g), F = 241° (déc.).

Le filtrat, c'est-à-dire le sel de sodium du DL-erythro en solution dans l'éthanol, est traité de la même manière et l'on obtient la DL-erythro-β-hydroxy-leucine cristallisée (2,8g), F = 262° (déc.).

Spectres I.R. (nujol) : ils sont identiques à ceux publiés (71).

Spectres de R.M.N. (D₂O) :

- DL-thréo (sous forme de chlorhydrate) : (CH₃)₂CH, 2d (J=6,5) à 1,01 et 1,07 ; (CH₃)₂CH, m (J=2, J'=8) à 1,81 ; CHOH, d dédoublé (J=3,5, J'=8) à 3,91 ; CHNH, d (J=3,5) à 4,22.
- DL-erythro : (CH₃)₂CH, d (J=6,5) à 1,01 ; (CH₃)₂CH, m à 1,93 ; CHOH, d dédoublé (J=3,2, J'=8,7) à 3,60 ; CHNH, d (J=3,2) à 3,97.

Synthèse des N-diméthyl-β-hydroxy (ou β-méthoxy)- acides aminés

0,200g de produit sont hydrogénés, en solution dans 15cm³ de mélange méthanol/eau à parties égales, en présence de 1cm³ de formol à 30% et de 0,200g de charbon palladié à 10%, pendant une nuit à la pression atmosphérique et à la température ambiante. La quantité théorique d'hydrogène est absorbée. Le charbon est filtré et la solution évaporée à sec. L'excès de formol est éliminé par évaporation de petites quantités d'eau ajoutées au résidu. Le produit brut obtenu est généralement cristallisé dans l'éthanol absolu.

N-diméthyl-β-hydroxy-leucine

Le dérivé DL-thréo cristallise par dissolution dans le minimum d'eau et addition d'éthanol absolu, F = 247° (déc.).

Le dérivé DL-erythro est obtenu cristallisé par addition d'acétone à la solution du produit dans l'éthanol absolu, F = 205°.

Spectres I.R. (nujol) : - DL-thréo : H mobiles à 3270cm⁻¹ ; C=O acide à 1590cm⁻¹ ;
 - DL-erythro : H mobiles à 3130cm⁻¹ ; C=O acide à 1650 et 1635cm⁻¹.

Spectres de R.M.N. (D_2O) :

- DL-thréo : $(CH_3)_2CH$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à 0,93 et 1,02 ; $(CH_3)_2CH$, $\underline{m}$ à 1,75 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,99 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=10$) à 3,62 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{d}$ dédoublé ($J=10$, $J'=2,8$) à 3,92 .
- DL-erythro (chlorhydrate) : $(CH_3)_2CH$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à 1,01 et 1,06 ; $(CH_3)_2CH$, $\underline{m}$ à 1,80 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 3,01 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{d}$ dédoublé ($J=3$, $J'=9,7$) à 3,82 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=3$) à 4,16.

Spectres de masse : pics M^+ à m/e 175.

N-diméthyl- β -phénylsérine

Le dérivé DL-thréo cristallise dans un mélange éthanol/eau, $F = 231^\circ$ (déc.).

Le dérivé DL-erythro cristallise dans l'éthanol à 95° , $F = 212^\circ$ (déc.).

Spectres I.R. (nujol) :

- DL-thréo : H mobiles à $3160cm^{-1}$; C=O acide à $1600cm^{-1}$.
- DL-erythro : H mobiles à $3480cm^{-1}$; C=O acide à $1635cm^{-1}$.

Spectres de R.M.N. (D_2O) :

- DL-thréo : $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 3,01 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=9,8$) à 3,87 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{d}$ ($J=9,8$) à 5,04 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,42.
- DL-erythro : $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,99 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=4$) à 3,74 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{d}$ ($J=4$) à 5,36 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,40.

Spectres de masse : pic $M^+ = 209$.

N-diméthyl-thréonine

Le dérivé DL-thréo cristallise dans un mélange éthanol/acétone, $F = 208^\circ$ (déc.).

Le dérivé DL-erythro cristallise dans l'éthanol absolu, mais les cristaux obtenus sont très hygroscopiques.

Spectres I.R. (nujol) :

- DL-thréo : H mobiles à $3320cm^{-1}$; C=O acide à $1610cm^{-1}$.
- DL-erythro : H mobiles à $3400cm^{-1}$; C=O acide à $1625cm^{-1}$.

Spectres de R.M.N. (D_2O) :

- DL-thréo : CH_3 , $\underline{d}$ ($J=6,2$) à 1,34 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 3,00 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=9,5$) à 3,49 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{q}$ dédoublé ($J=9,5$, $J'=6,2$) à 4,19.
- DL-erythro : CH_3 , $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 1,35 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,97 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=3,5$) à 3,52 ; $\underline{CHOH}$, $\underline{q}$ dédoublé ($J=3,5$, $J'=6,5$) à 4,39.

Spectres de masse : pic $M^+ = 147$.

N-diméthyl- β -méthoxy-leucine

Le dérivé DL-thréo est cristallisé dans l'éthanol absolu, $F = 190^\circ$ (déc.).

Le dérivé DL-erythro est cristallisé dans un mélange éthanol/éther, $F = 177^\circ$ (déc.).

Spectres I.R. (nujol) :

- DL thréo : $C=O$ acide à $1625cm^{-1}$; $C-O-C$ à $1245cm^{-1}$.
- DL-erythro : $C=O$ acide à $1625cm^{-1}$; $C-O-C$ à $1260cm^{-1}$.

Spectres de R.M.N. (D_2O) (sur les chlorhydrates) :

- DL-thréo : $(CH_3)_2CH$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à 0,99 et 1,10 ; $(CH_3)_2\overline{CH}$, $\underline{m}$ à 1,90 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 3,03 ; OCH_3 , $\underline{s}$ à 3,59 ; $\underline{CHOR}$, $\underline{d}$ dédoublé ($J=8,5$, $J'=4$) à 3,70 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=8,5$) à 3,98.
- DL-erythro : $(CH_3)_2CH$, $\underline{2d}$ ($J=6,8$) à 1,04 et 1,12 ; $(CH_3)_2\overline{CH}$, $\underline{m}$ à 2,08 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 3,05 ; OCH_3 , $\underline{s}$ à 3,62 ; $\underline{CHOR}$, $\underline{d}$ dédoublé ($J=3$, $J'=8,5$) à 3,77 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=3$) à 4,16.

Spectres de masse : pic $M^+ = 189$.

N-diméthyl- β -(p-tolyloxy)-leucine

0,029g de β -(p-tolyloxy)-leucine sont N-diméthylés selon la méthode générale décrite antérieurement. On obtient ainsi 0,030g de dérivé N-diméthylé pur en CCM.

Spectre de R.M.N. (D_2O) (sous forme de chlorhydrate) : $(CH_3)_2CH$, $\underline{2d}$ ($J=7$) à 1,02 et 1,13 ; $ArCH_3$, $\underline{s}$ à 2,29 ; $N(CH_3)_2$, $\underline{s}$ à 2,91 ; $\underline{CHNR}_2$, $\underline{d}$ ($J=2,5$) à 4,14 ; $\underline{CHO\phi}$, $\underline{d}$ dédoublé ($J=2,5$, $J'=8,6$) à 4,73 ; entre 6,97 et 7,34, système A_2B_2 ($J_{AB}=9$) du noyau benzénique para-disubstitué.

Spectre de masse : pic $M^+ = 281$

50 Synthèse des DL-thréo et DL-érythro- β -méthoxy-leucines

52 N-benzyloxycarbonyl- β -hydroxy-leucine

Le produit 52 est préparé à partir de la β -hydroxy-leucine selon la méthode décrite pour 32 (N-benzyloxycarbonyl- β -phénylsérine). Le dérivé DL-thréo cristallise dans un mélange éther hexane, $F = 103^\circ$. Le dérivé DL-érythro cristallise dans l'éther, $F = 118^\circ$.

Spectres I.R. (nujol) :

- DL-thréo : CONH à 3390 , 1705 et 1540cm^{-1} ; H mobiles à 3280cm^{-1} .
- DL-érythro : CONH à 3405 , 1710 et 1550cm^{-1} ; H mobiles à 3290cm^{-1} .

Spectres de R.M.N. (CDCl_3) :

- DL-thréo : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{2d}$ ($J=6$) à $0,87$ et $0,96$; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ ($J=6$, $J'=2$) à $1,08$; CHOH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=2$, $J'=9,5$) à $3,77$; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=9,5$, $J'=9$) à $4,51$; $\varphi\text{CH}_2\text{O}$, $\underline{s}$ à $5,10$; NH, $\underline{d}$ ($J=9$) à $5,97$; OH, pic large à $6,42$; C_6H_5 , $\underline{s}$ à $7,32$.
- DL-érythro : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{d}$ ($J=6,5$) à $0,99$; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ ($J=6,5$, $J'=7,5$) à $1,84$; CHOH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=7,5$, $J'=4$) à $3,49$; OH, pic large à $3,87$; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=4$, $J'=8$) à $4,47$; $\varphi\text{CH}_2\text{O}$, $\underline{s}$ à $5,14$; NH, $\underline{d}$ ($J=8$) à $6,00$; C_6H_5 , $\underline{s}$ à $7,38$.

Spectres de masse : pic $M^+ = 281$.

53 N-benzyloxycarbonyl- β -hydroxy-leucine-méthyl-ester

$1,800\text{g}$ de dérivé 52 sont dissous dans 2cm^3 de méthanol et additionnés de 30cm^3 de solution étherée de diazométhane. Après 1h . 15 à la température ambiante, on évapore à sec. Le résidu obtenu est pur en CCM, il ne cristallise pas dans les solvants organiques usuels.

Spectres I.R. (CDCl_3) :

- DL-thréo : CONH à 3440 , 1725 et 1505cm^{-1} .
- DL-érythro : CONH à 3430 , 1725 et 1505cm^{-1} .

Spectres de R.M.N. (CDCl_3) :

- DL-thréo : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à 0,93 et 1,00 ; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ ($J=6,5$, $J'=2$) à 1,81 ; CHOH , $\underline{d}$ dédoublé à 3,70 ; COOCH_3 , $\underline{s}$ à 3,75 ; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=9,5$, $J'=2$) à 4,52 ; CH_2O , $\underline{s}$ à 5,14 ; NH , $\underline{d}$ ($J=9,5$) à 5,67 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.
- DL-erythro : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{d}$ ($J=6$) à 0,98 ; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ à 1,72 ; OH pic large à 2,43 ; CHOH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=4$, $J'=8$) à 3,49 ; COOCH_3 , $\underline{s}$ à 3,75 ; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=4$, $J'=8,5$) à 4,52 ; CH_2O , $\underline{s}$ à 5,13 ; NH , $\underline{d}$ ($J=8,5$) à 5,82 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.

Spectres de masse : pic $\text{M}^+ = 295$.54 N-benzyloxycarbonyl- β -méthoxy-leucine-méthyl-ester

1,860g de dérivé 53 sont dissous dans 20cm^3 d'éther, la solution est refroidie à 0° et additionnée de $0,30\text{cm}^3$ d'éthérate de BF_3 en solution dans 20cm^3 d'éther. On ajoute alors, sous agitation, 500cm^3 de solution étherée de diazométhane par fractions de 20cm^3 pendant 7 heures.

A la fin de la réaction, l'excès de diazométhane est détruit par de l'acide acétique, la solution étherée est filtrée, puis lavée par une solution de bicarbonate de sodium. La phase organique fournit un résidu de 1,865g chromatographié sur 75g de silice. On élue au chlorure de méthylène 0,640g de produit pur en CCM, mais qui ne cristallise pas dans les solvants organiques usuels.

Spectres I.R. (CHCl_3) :

- DL-thréo : CONH à 3440, 1725 et 1505cm^{-1} ; C-O-C à 1270cm^{-1} .
- DL-erythro : CONH à 3430, 1725 et 1500cm^{-1} ; C-O-C à 1260cm^{-1} .

Spectres de R.M.N. (CDCl_3) :

- DL-thréo : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à 0,93 et 0,99 ; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ à 1,79 ; OCH_3 , $\underline{s}$ à 3,33 ; CHOR , $\underline{d}$ dédoublé ($J=9$, $J'=2$) à 3,34 ; COOCH_3 , $\underline{s}$ à 3,77 ; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=9$, $J'=2$) à 4,48 ; CH_2O , $\underline{s}$ à 5,14 ; NH , $\underline{d}$ ($J=9$) à 5,47 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.
- DL-erythro : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{d}$ ($J=6,5$) à 0,99 ; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ à 1,84 ; CHOR , $\underline{d}$ dédoublé ($J=4,5$, $J'=7$) à 3,14 ; OCH_3 , $\underline{s}$ à 3,44 ; COOCH_3 , $\underline{s}$ à 3,76 ; CHNH , $\underline{d}$ dédoublé ($J=4,5$, $J'=9$) à 4,59 ; CH_2O , $\underline{s}$ à 5,13 ; NH , $\underline{d}$ ($J=9$) à 5,48 ; C_6H_5 , $\underline{s}$ à 7,36.

Spectres de masse : pic $\text{M}^+ = 309$.

55 N-benzyloxycarbonyl- β -méthoxy-leucine

0,635g de produit 54 sont dissous dans 10cm³ de potasse méthanolique 0,5N contenant 20% d'eau. Après 3 heures de contact à la température ambiante, on dilue à l'eau, acidifie par HCl et extrait à l'acétate d'éthyle. Le résidu obtenu (0,610g) pur en CCM ne cristallise pas dans les solvants organiques usuels.

Spectres I. R. (CHCl₃) :

- DL-thréo : CONH à 3435, 1720 et 1510cm⁻¹ ; C-O-C à 1270cm⁻¹.
- DL-erythro : CONH à 3430, 1720 et 1505cm⁻¹ ; C-O-C à 1250cm⁻¹.

Spectres de R. M. N. (CDCl₃) :

- DL-thréo : (CH₃)₂CH, 2d (J=6,5) à 0,92 et 1,00 ; (CH₃)₂CH, m à 1,82 ; OCH₃, s à 3,38 ; CHOR, d dédoublé à 3,42 ; CHNH, d dédoublé (J=4, J'=9,5) à 4,52 ; φ CH₂O, s à 5,15 ; NH, d (J=9,5) à 5,60 ; C₆H₅, s à 7,35.
- DL-erythro : (CH₃)₂CH, d (J=6,5) à 0,99 ; (CH₃)₂CH, m à 1,93 ; CHOR, d dédoublé (J=4, J'=8) à 3,20 ; OCH₃, s à 3,46 ; CHNH, d dédoublé (J=4, J'=8,5) à 4,62 ; φ CH₂O, s à 5,14 ; NH, d (J=8,5) à 5,62 ; C₆H₅, s à 7,36.

Spectres de masse : pic M⁺ = 295.

56 β -méthoxy-leucine

0,510g de produit 55 sont dissous dans 20cm³ de méthanol et hydrogénés en présence de 0,150g de charbon palladié à 10% et de 0,25cm³ d'HCl concentré, à la température ambiante et à la pression atmosphérique pendant 4 heures. Le charbon est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé à sec. On reprend plusieurs fois avec de l'éthanol absolu, en évaporant à chaque fois la solution obtenue à sec, pour éliminer l'excès d'HCl.

Finalement, le résidu (0,330g) est dissous dans 20cm³ d'eau et la solution est passée sur une colonne de 20cm³ de résine amberlite IR 120 en phase H⁺. Le produit fixé par la résine, est élué par 800cm³ d'ammoniaque à 3%. La solution alcaline, évaporée à sec, fournit 0,228g de produit qui est cristallisé dans l'éthanol absolu, F = 245° (déc.) pour DL-thréo et DL-erythro.

Analyse : C₇H₁₅O₃N

calc. %	C 52,15	H 9,38	O 29,78	N 8,69
tr. %	52,07	9,32	29,85	8,78

Spectres I.R. (nujol) :

- DL-thréo : H mobiles à 3210cm^{-1} ; C=O acide à 1640 et 1580cm^{-1} .
- DL-erythro : H mobiles à 3120cm^{-1} ; CO acide à 1615 et 1595cm^{-1} .

Spectres de R.M.N. (D_2O) :

- DL-thréo (chlorhydrate) : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{2d}$ ($J=6,5$) à $1,00$ et $1,09$; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ à $1,81$; OCH_3 , $\underline{s}$ à $3,51$; CHOR , $\underline{d}$ dédoublé ($J=2,5$, $J'=9$) à $3,65$; CHNH , $\underline{d}$ ($J=2,5$) à $4,17$.
- DL-erythro : $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{2d}$ ($J=6,8$) à $0,97$ et $1,03$; $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$, $\underline{m}$ ($J=6,8$, $J'=8$) à $1,77$; CHOR , $\underline{d}$ dédoublé ($J=3,5$, $J'=8$) à $3,48$; OCH_3 , $\underline{s}$ à $3,52$; CHNH , $\underline{d}$ ($J=3,5$) à $4,10$.

Spectres de masse : pic $\text{M}^+ = 161$, pics à m/e 130 (M-31), 116 (M-45), 87 , 74 .

x
x x

CONCLUSION

Au cours de ce travail, l'étude de la structure plane et de la configuration de neuf alcaloïdes peptidiques isolés de quatre plantes d'origine exotique a été réalisée. Ces alcaloïdes sont :

- l'hymenocardine, extraite de l'Hymenocardia acida Tul. (Hymenocardiacees)
- les lasiodines A et B, extraites du Lasiodiscus marmoratus C.H. Wright (Rhamnacees)
- les adouétines X, Y et Z, extraites du Waltheria americana L. (Sterculiacees)
- les myrianthines A, B et C, extraites du Myrianthus arboreus P. Beauv. (Urticacees).

La structure plane de ces alcaloïdes a été déterminée :

- . soit par dégradation chimique : hymenocardine et lasiodine A ;
- . soit par spectrométrie de masse et analyse en CCM des produits d'hydrolyse acide : lasiodine B, adouétines et myrianthines.

Quant à la configuration des éléments constituant ces alcaloïdes, elle a été établie :

- . pour les acides α aminés normaux et N-méthylés, par mesure du pouvoir rotatoire, ou par synthèse stéréospécifique lorsque le fragment isolé est un peptide.

. pour les acides α aminés β hydroxylés dont la fonction alcool est engagée dans une liaison éther de phénol avec l'hydroxyle d'un aminophénol, une méthode d'étude a été proposée. Cette méthode semble générale, elle permet de déterminer la configuration THREO ou ERYTHRO d'un acide α aminé β hydroxylé ou β éthérifié par R. M. N.

Parallèlement à ce travail, certaines équipes de chercheurs ont déterminé la structure d'autres alcaloïdes peptidiques, la comparaison de ces structures a montré qu'il s'agissait d'une nouvelle classe de substances naturelles que nous avons appelé "alcaloïdes peptidiques". Ceux-ci se distinguent des simples peptides par deux caractéristiques structurales constantes :

- . ils comportent toujours un fragment non peptidique, constitué par un aminophénol.
- . ils comportent toujours un acide α aminé N-terminal, dont la fonction amine libre est un groupe $N(CH_3)_2$ ou plus rarement $NHCH_3$.

La comparaison des structures de ces alcaloïdes peptidiques a permis d'autre part d'en proposer une classification en trois groupes :

- . alcaloïdes cycliques de type 4
- . alcaloïdes cycliques de type 5
- . alcaloïdes "ouverts"

Les connaissances acquises, tant au cours de ce travail que par les autres chercheurs, ont permis de dégager certaines lois générales sur la constitution de ces alcaloïdes peptidiques et de définir une méthode d'étude simple, applicable quelle que soit la nature des acides aminés présents dans l'alcaloïde.

Il est logique de penser que d'autres substances analogues seront découvertes, et que la méthode mise au point pourra permettre d'en déterminer rapidement la structure.

x

x

x

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. PAĚS, X. MONSEUR, X. LUSINCHI et R. GOUTAREL, Bull. Soc. chim., 1964, p. 817.
- 2 O. BLANPIN et X. MONSEUR, Revue Médicale de Tours, 1960, p. 681.
- 3 M. PAĚS, F.X. JARREAU, X. LUSINCHI et R. GOUTAREL, Ann. Chim., 1966, p. 83.
- 4 E.L. MENARD, J.M. MÜLLER, A.F. THOMAS, S.S. BHATNAGAR et N.J. DASTOOR, Helv. chim. Acta, 1963, 46, 1801.
- 5 E. ZBIRAL, E.L. MENARD et J.M. MÜLLER, Helv. chim. Acta, 1965, 48, 404.
- 6 E.W. WARNHOFF, J.C.N. MA et P. REYNOLDS-WARNHOFF, J. amer. chem. Soc., 1965, 87, 4198.
- 7 E.W. WARNHOFF, S.K. PRADHAN et J.C.N. MA, Canad. J. chem., 1965, 43, 2594.
- 8 M. PAĚS, J. MAINIL et R. GOUTAREL, Ann. pharm. fr., 1963, 21, 139.
- 9 a M. PAĚS, J. MARCHAND, X. MONSEUR, F.X. JARREAU et R. GOUTAREL, C.R. Acad. Sci., 1967, 264, série C, 1409.
- b M. PAĚS, J. MARCHAND, G. RATLE et F.X. JARREAU, Bull. Soc. chim., 1968, p. 2979.
- 10 M. ASSCHER, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, 1949, 68, 962.
- 11 R.E. BOWMAN, J. chem. Soc., 1950, p. 1349.
- 12 R.A. BOISSONNAS, Helv. chim. Acta, 1951, 34, 874.
- 13 J.R. VAUGHAN Jr. et R.L. OSATO, J. amer. chem. Soc., 1952, 74, 676.

- 14 T. WIELAND et H. BERNHARD, Ann., 1951, 572, 190.
- 15 C.B. ANFINSEN et R.R. REDFIELD, Adv. Prot. chem., 1956, 11, 7.
- 16 L.C. KING, M. McWHIRTER et D.M. BARTON, J. amer. chem. Soc., 1945, 67, 2089.
- 17 M. PAÏS, Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris 1965.
- 18 R. TSCHESCHE, R. WELTERS et H.W. FEHLHABER, Chem. Ber., 1967, 100, 323.
- 19 R. TSCHESCHE, J. RHEINGANS, H.W. FEHLHABER et G. LEGLER, Chem. Ber., 1967, 100, 3924.
- 20 R. TSCHESCHE, H. LAST et H.W. FEHLHABER, Chem. Ber., 1967, 100, 3937.
- 21 J. MARCHAND, M. PAÏS, X. MONSEUR et F.X. JARREAU, Tetrahedron, 1969, 25, 937.
- 22 H. MÖHRLE et R. KILIAN, Tetrahedron, 1969, 25, 5745.
- 23 P. QUITT, J. HELLERBACH et K. VOGLER, Helv. chim. Acta, 1963, 46, 327.
- 24 J.P. GREENSTEIN et M. WINITZ, "Chemistry of amino-acids", Wiley, New-York, Londres, 1961, p. 2638.
- 25 K.N.F. SHAW et S.W. FOX, J. amer. chem. Soc., 1953, 75, 3421.
- 26 J.P. GREENSTEIN et M. WINITZ, "Chemistry of amino-acids", Wiley, New-York, Londres, 1961, p. 895.
- 27 W.S. FONES, J. biol. Chem., 1953, 204, 323.
- 28 H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI et D.H. WILLIAMS, "Interpretation of Mass Spectra of organic compounds", Holden-Day, San-Francisco, 1964, a) p. 170 ; b) p. 227.
- 29 M. PAÏS, J. MARCHAND, F.X. JARREAU et R. GOUTAREL, Bull. Soc. chim., 1968, p. 1145.
- 30 J. MARCHAND, X. MONSEUR et M. PAÏS, Ann. pharm. fr., 1968, 26, 771.
- 31 J.C.N. MA et E.W. WARNHOFF, Canad. J. Chem., 1965, 43, 1849.
- 32 P. WOLLENWEBER, J. of Chromatography, 1962, 9, 369.
- 33 M. JUSTISZ et P. de la LLOSA, Bull. Soc. chim., 1963, p. 2913.
- 34 R. TSCHESCHE, L. BEHRENDT et H.W. FEHLHABER, Chem. Ber., 1969, 102, 50.
- 35 I.U.P.A.C. - I.U.B., Commission on Biochemical Nomenclature, Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 1966, 121, 1
- 36 R. TSCHESCHE et H. LAST, Tetrahedron Letters, 1968, p. 2993.
- 37 G. BOULVIN, R. OTTINGER, M. PAÏS et G. CHIURDOGLU, Bull. Soc. chim., belges, 1969, 78, 583.
- 38 D. JAKUES et J.A. LEISTEN, J. chem. Soc., 1961, p. 4963.
- 39 H. HART et R.J. ELIA, J. amer. chem. Soc., 1961, 83, 985.
- 40 R. HIRSCHMANN, G.A. BAILEY, R. WALKER et J.M. CHEMERDA, J. amer. chem. Soc., 1959, 81, 2822.

- 41 R. CRIEGEE, L. KRAFT et B. RANK, *Ann.*, 1933, 507, 159 ;
R. CRIEGEE, "Oxidation in organic chemistry, Part A, K.B. WIBERG,
Academic Press, New-York et Londres, 1965.
- 42 M. BODANSZKY, J. IZDEBSKI et I. MURAMATSU, *J. amer. chem. Soc.*,
1969, 91, 2351.
- 43 H. VANDERHAEGHE et G. PARMENTIER, *J. amer. chem. Soc.*, 1960, 82, 4414.
- 44 M. KARPLUS, *J. chem. phys.*, 1959, 30, 11.
- 45 M. KARPLUS, *J. amer. chem. Soc.*, 1963, 85, 2870.
- 46 K.G.R. PACHLER, *Spectrochim. Acta*, 1963, 19, 2085.
- 47 K.G.R. PACHLER, *Spectrochim. Acta*, 1964, 20, 581.
- 48 R.J. ABRAHAM et K.A. McLAUCHLAN, *Mol. Phys.*, 1962, 5, 513.
- 49 Y. IKUTANI, T. OKUDA et S. AKABORI, *Bull. chem. Soc. Japan*, 1960, 33, 582.
- 50 R.B. MARTIN et R. MATHUR, *J. amer. chem. Soc.*, 1965, 87, 1065.
- 51 V. PRELOG, O. HÄFLIGER, *Helv. chim. Acta*, 1950, 33, 2021.
- 52 M. SVOBODA, J. JONAS et J. SICHER, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 1958, 23,
1551.
- 53 J. SICHER, M. TICHY, F. SIPOS, M. SVOBODA et J. JONAS, *Coll. Czech.
Chem. Comm.*, 1964, 29, 1561.
- 54 J.W. EMSLEY, J. FEENEY et L.H. SUTCLIFFE, "High Resolution Nuclear
Magnetic Resonance Spectroscopy", Pergamon Press, 1965, vol. I, p. 549.
- 55 G.C. PIMENTEL et A.L. McCLELLAN, "The Hydrogen Bond", W.H. FREEMAN,
San Francisco et Londres, 1960.
- 56 F. TADDEI et L. PRATT, *J. chem. Soc.*, 1964, p. 1553.
- 57 H. OGURA, Y. ARATA et S. FUJIWARA, *J. mol. Spectroscopy*, 1967, 23, 76.
- 58 R.H. ANDREATTA, V. NAIR, A.V. ROBERTSON, *Austral. J. Chem.*, 1967, 20,
2701.
- 59 R. J. ABRAHAM et W.A. THOMAS, *J. chem. Soc.*, 1964, p. 3739.
- 60 J. CANCEILL, J.J. BASSELIER et J. JACQUES, *Bull. Soc. chim.*, 1967, p. 1024.
- 61 J. CANCEILL et J. JACQUES, *Bull. Soc. chim.*, 1970, p. 2180.
- 62 M. NEEMAN, M.C. CASERIO, J.D. ROBERTS et W.S. JOHNSON, *Tetrahedron*,
1959, 6, 36.
- 63 E. MÜLLER et W. RUNDEL, *Angew. Chem.*, 1958, 70, 105.
- 64 L. LABLER, Vl. SCHWARTZ et coll., "Chromatography na tenké vrstvě", Prague,
1965, p. 45.
- 65 J. PITRA et J. STERBA, *Chem. Listy*, 1953, 57, 389.
- 66 T. CURTIUS, *Ber.*, 1898, 31, 2490.
- 67 P. RONKAINEN, *J. of chromatography*, 1963, 11, 328.
- 68 J. COMIN et W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv. chim. Acta*, 1959, 42, 1730.

- 69 R.B. WOODWARD et W.E. DOERING, J. amer. chem. Soc., 1945, 67, 870.
- 70 M. SATO, K. OKAWA et S. AKABORI, Bull. chem. Soc. Japan, 1957, 30, 937.
- 71 S. DALBY, G.W. KENNER et R.C. SHEPPARD, J. chem. Soc., 1960, p. 968.



Vu et approuvé :

Orsay, le 3 Juillet 1970

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. POITOU

